

W. 19/08

ART B. 100
IMAGINATION

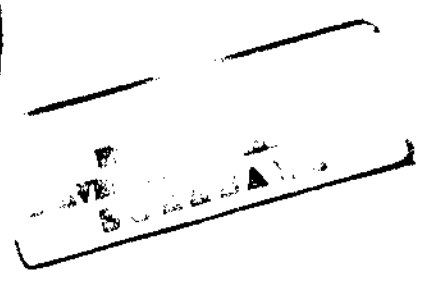
SKRIPSI

EKA KURNIAWATI

PENENTUAN SIFAT LIPOFILIK (R_m) DAN STERIK (Refraksi Molar) DARI SIPROFLOKSASIN DAN OFLOKSASIN SERTA AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA (KHM) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

FF 13/08

Kur
P



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2007**

Lembar Pengesahan

**PENENTUAN SIFAT LIPOFILIK (R_m) DAN STERIK
(Refraksi Molar) DARI SIPROFLOKSASIN DAN
OFLOKSASIN SERTA AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA
(KHM) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2007

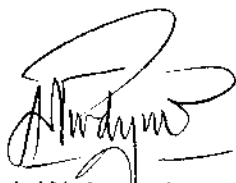
Oleh :

EKA KURNIAWATI

NIM : 050312722

Skripsi ini telah disetujui
4 September 2007 oleh :

Pembimbing Utama



Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si.
NIP. 132 011 698

Pembimbing Serta



Ir. Hj. Rully Susilowati, MS.
NIP. 131 569 381

(94:1-8)

RINGKASAN

Penentuan Sifat Lipofilik (R_m) Dan Sterik (Refraksi Molar) Dari Siprofloksasin Dan Ofloksasin Serta Aktivitas Antibakterinya (KHM) Terhadap *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853

Siprofloksasin dan ofloksasin adalah antibakteri golongan 4-kuinolon yang penggunaannya cukup luas untuk kepentingan medis. Selain itu keduanya memiliki keunikan sifat, yaitu sama-sama memiliki efek penghambatan terhadap bakteri yang lebih cepat dibandingkan dengan senyawa dari golongan 4-kuinolon lainnya.

Adanya perbedaan substituen pada inti 4-kuinolon dari siprofloksasin dan ofloksasin akan menyebabkan perbedaan sifat fisikokimia yang juga akan berpengaruh pada aktivitas biologisnya. Oleh karena itu, ingin diketahui apakah perbedaan substituen pada inti 4-kuinolon menyebabkan perbedaan sifat fisikokimia dari siprofloksasin dan ofloksasin dan selanjutnya bagaimanakah pengaruh perbedaan sifat fisikokimia tersebut terhadap aktivitas antibakterinya pada *Pseudomonas aeruginosa*.

Dari beberapa sifat fisikokimia, yang ditentukan dalam penelitian ini adalah sifat lipofilik (R_m) dan sifat sterik (Refraksi Molar). Pada penelitian ini juga ditentukan aktivitas antibakteri dari siprofloksasin dan ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. R_m ditentukan melalui metode KLTFB dengan menggunakan fase diam Kieselgel 60F254 yang diimpregnasi dengan larutan n-oktanol 5% dalam eter dan sebagai fase gerak adalah beberapa campuran metanol-air dalam berbagai perbandingan. Selanjutnya, nilai R_m senyawa ditentukan melalui kurva hubungan antara % metanol (v/v) dalam eluen (sumbu x) dengan nilai R_m senyawa pada konsentrasi tersebut (sumbu y) dan nilai R_m senyawa dalam sistem oktanol-air dapat diperoleh pada konsentrasi metanol 0%.

Nilai parameter sterik (Refraksi Molar) ditentukan dengan persamaan Lorentz – Lorenz melalui pengukuran indeks bias serta densitas larutan siprofloksasin dan ofloksasin dalam metanol pada suhu 30°C. Sedangkan Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode dilusi sehingga diperoleh kadar minimal antibakteri (KHM) yang mampu menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh, nilai R_m (sifat lipofilik) untuk siprofloksasin (0,568) lebih besar daripada ofloksasin (0,042), dan ini menunjukkan bahwa siprofloksasin lebih lipofilik daripada ofloksasin. Refraksi Molar (sifat sterik) untuk siprofloksasin (215,75 cc/mol) lebih kecil daripada ofloksasin (289,43 cc/mol), dan ini menunjukkan bahwa volume molar siprofloksasin lebih kecil daripada ofloksasin. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* untuk siprofloksasin ditunjukkan dengan KHM sebesar 1,00 µg/ml, sedangkan KHM ofloksasin adalah 10,00 µg/ml, yang berarti bahwa aktivitas siprofloksasin yang lebih tinggi daripada ofloksasin.

Dari hasil penelitian tersebut dapat diketahui bahwa aktivitas siprofloksasin yang lebih tinggi daripada ofloksasin dipengaruhi oleh nilai Rm yang tinggi dan nilai Refraksi Molar yang rendah. Nilai Rm yang lebih kecil dan nilai Refraksi Molar yang lebih besar pada ofloksasin berpengaruh pada besarnya aktivitas, sehingga untuk memperoleh turunan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar perlu dilakukan modifikasi terhadap substituen rantai samping inti 4-kuinolonya.

ABSTRACT

Determination of the Lipophilic (R_m) and Steric (MR) Characteristics of Ciprofloxacin and Ofloxacin and Their Antibacterial Activities against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

This research was aim to determine of the lipophilic characteristics (R_m), steric characteristics (MR) and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 of ciprofloxacin and ofloxacin. From the research, the influence of the physicochemical characteristics of ciprofloxacin and ofloxacin on their antibacterial activities could be predicted.

The R_m values were analyzed by reversed phase thin layer chromatography (RP-TLC) method in various methanol-water concentration as eluents. The MR (Molar Refraction) was determined using Lorentz – Lorenz equation via Refractive index and density measurement of the compound solution on 30°C.

The result of the research showed that R_m value of ciprofloxacin (0,568) was higher than ofloxacin (0,042). It indicated that ciprofloxacin was more lipophilic than ofloxacin. The MR value of ciprofloxacin (215,75cc/mol) was lower than ofloxacin (289,43cc/mol). It showed that molar volume of ciprofloxacin was lower than ofloxacin. The experiments of antibacterial activity give MIC 1,00 µg/ml for ciprofloxacin and 10,00 µg/ml for ofloxacin which indicated that the antibacterial activity of ciprofloxacin was higher than ofloxacina. It concluded that the high R_m and the low MR of the compound could be influence the antibacterial activities.

Keywords: Physicochemical Characteristics (R_m and MR), ciprofloxacin, ofloxacin, antibacterial activity, *Pseudomonas aeruginosa*.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb,

Dengan mengucap rasa syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“PENENTUAN SIFAT LIPOFILIK (R_m) DAN STERIK (Refraksi Molar) DARI Siprofloksasin dan Ofloksasin serta aktivitas antibakterinya (KHM) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853”**, sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Universitas Airlangga.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari bantuan serta dukungan moril maupun materiil dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menghaturkan rasa terima kasih yang tulus sedalam – dalamnya kepada:

1. Dra. Nuzul Wahyuning Diah, M.Si selaku pembimbing utama yang telah banyak memberi bimbingan dan arahan dari awal penyusunan hingga terselesaikannya skripsi ini.
2. Ir. Hj. Rully Susilowati, MS selaku pembimbing serta yang telah memberikan arahan dan semangat dari awal penyusunan hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Seluruh staf pengajar di Laboratorium Kimia Medisinal atas bantuan dan dukungannya.
4. Dr. Sudjarwo, MS dan Dra. Juniar Soerjono, MS sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan kritik dan saran dalam perbaikan penyusunan skripsi ini.
5. Bapak Drs. Bambang Tri Purwanto, MS sebagai dosen wali yang selalu memberikan arahan dan dorongan dalam menyelesaikan skripsi ini.

6. Rektor Universitas Airlangga, atas perhatian yang diberikan dalam kemajuan pendidikan di Universitas Airlangga.
7. Dekan dan Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, atas bantuan yang telah diberikan dalam kemajuan pendidikan di Universitas Airlangga.
8. Seluruh staf pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, yang telah memberikan ilmunya kepada penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
9. Bapak Gampang dan Ibu tercinta Sukarmi yang sangat sabar dan tulus memberikan dukungan finansial dan dengan buaian kasih sayang serta do'a yang tidak pernah putus sepanjang malam yang akhirnya ananda dapat menyelesaikan amanah yang diberikan.
10. Sahabat-sahabat yang tercinta Nurul Indah K, Rani Fikratul F, Lini Kumiasari, Reni Candra P, July Antalena T, Melati Puspitasari, Nur Christine N K dan Ririn Nadlifah yang selalu membantu dan memberikan semangat serta inspirasi dalam belajar.
11. Seluruh teman-teman skripsi di bagian Kimia Farmasi terutama Laboratorium Kimia Medisinal Linda Kumiawati, Ni Nengah Marwinary, Ni Putu W Santhi, Susanti, Disha Amalia, Erveni, Rani Nur Badriyah dan semua teman-teman reguler genap, terima kasih atas bantuan dan kebersamaanya selama ini.
12. Seluruh teman-teman angkatan 2003, terima kasih atas kebersamaan dan kenangan-kenangan manisnya selama penulis belajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
13. Para Laboran Kimia Medisinal Pak Sutanto dan Pak Tukidjo, terima kasih atas semua bantuan yang telah diberikan.
14. Semua pihak, sahabat dan teman-teman tercinta yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat atas segala kebaikan dan bantuan yang telah diberikan.

Dalam penyusunan naskah skripsi ini, penulis telah berusaha semaksimal mungkin untuk menyempurnakannya. Namun, penulis tetap mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Semoga naskah skripsi ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu kefarmasian dan almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Surabaya, Agustus

2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	vi
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan tentang Bahan Obat.....	5
a. Siprofloksasin.....	5
b. Ofloksasin.....	5
2.2 Tinjauan tentang Hubungan Struktur dan Aktivitas Biologis Ditinjau dari Segi Pendekatan Sifat Fisikokimia.....	6
2.2.1 Sifat Lipofilik.....	6
2.2.2 Sifat Elektronik.....	8
2.2.3 Sifat Sterik.....	9
2.3 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis Fase Balik.....	10
2.4 Tinjauan tentang Aktivitas Antibakteri secara Mikrobiologis.....	11
2.4.1 Metode Dilusi.....	12
2.4.2 Metode Difusi.....	13
2.5 Tinjauan Tentang <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.5.1 Morfologi.....	14
2.5.2 Kultur dan Biakan.....	14
2.5.3 Sifat Pertumbuhan.....	14

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	15
3.1 Uraian Kerangka Konseptual	15
3.2 Skema Kerangka Konseptual	16
BAB IV BAHAN, PERALATAN DAN METODE PENELITIAN	
4.1 Bahan-bahan	17
4.2 Alat-alat	17
4.3 Metode Penelitian.....	17
4.3.1 Analisis Kualitatif terhadap Bahan Penelitian (Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853).....	17
4.3.2 Penentuan Sifat Rm	18
a. Impregnasi Lempeng Kromatografi	18
b. Penentuan Rm	18
4.3.3 Penentuan Refraksi Molar (RM)	19
4.3.4 Penetapan Kadar Hambat Minimal Larutan Uji terhadap Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	19
a. Penyiapan Inokulum Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
b. Penentuan Kadar Hambat Minimal	20
BAB V HASIL PENELITIAN	23
5.1 Hasil Pemeriksaan Kualitatif terhadap Bahan Obat	23
5.2 Identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	23
5.3 Penentuan Nilai Rm	24
5.3.1 Penentuan Nilai Rm Siprofloksasin	24
5.3.2 Penentuan Nilai Rm Ofloksasin	26
5.4 Penentuan Nilai Refraksi Molar Senyawa Uji Antibakteri	30
5.4.1 Penentuan Nilai Refraksi Molar Metanol.....	30
5.4.2 Penentuan Nilai Refraksi Molar Siprofloksasin.....	30
5.4.3 Penentuan Nilai Refraksi Molar Ofloksasin.....	31
5.5 Penentuan Kadar Hambat Minimal	31
BAB VI PEMBAHASAN	35
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	38
7.1 Kesimpulan.....	38
7.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	41

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1 Struktur Kimia Siprofloksasin.....	2
Gambar 1.2 Struktur Kimia Ofloksasin.....	2
Gambar 4.1 Skema Pelaksanaan Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Kadar Hambat Minimal.....	22
Gambar 5.1 Pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 pada Mueller Hinton Agar	23
Gambar 5.2 Kurva Hubungan Antara %v/v Metanol dalam Eluen Metanol-Air Dengan Nilai Rm Siprofloksasin.....	25
Gambar 5.3 Kurva Hubungan Antara %v/v Metanol dalam Eluen Metanol-Air Dengan Nilai Rm Ofloksasin	27
Gambar 5.4 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 50%.....	28
Gambar 5.5 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 60%.....	28
Gambar 5.6 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 70%.....	29
Gambar 5.7 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 80%.....	29
Gambar 5.8 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Siprofloksasin terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	34
Gambar 5.9 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ofloksasin terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	34

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel V.1 Nilai Rm Siprofloksasin dengan Eluen Metanol-Air	24
Tabel V.2 Nilai Rm Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air	26
Tabel V.3 Nilai Rm Siprofloksasin dan Ofloksasin	27
Tabel V.4 Hasil Penentuan Refraksi Molar Metanol pada Suhu 30 ⁰ C	30
Tabel V.5 Hasil Penentuan Refraksi Molar Siprofloksasin pada Suhu 30 ⁰ C.....	30
Tabel V.6 Hasil Penentuan Refraksi Molar Ofloksasin pada Suhu 30 ⁰ C	31
Tabel V.7 Hasil Uji Aktivitas Siprofloksasin terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	32
Tabel V.8 Hasil Uji Aktivitas Siprofloksasin terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Penentuan Persamaan Regresi untuk Memperoleh Nilai Rm Siprofloksasin dalam Sistem Oktanol-Air.....	41
Lampiran 2 Penentuan Persamaan Regresi untuk Memperoleh Nilai Rm Ofloksasin dalam Sistem Oktanol-Air	42
Lampiran 3 Perhitungan Refraksi Molar Metanol.....	43
Lampiran 4 Perhitungan Refraksi Molar Siprofloksasin	44
Lampiran 5 Perhitungan Refraksi Molar Ofloksasin	45
Lampiran 6 Tabel Harga r.....	46
Lampiran 7 Sertifikat Analisis Siprofloksasin.....	47
Lampiran 8 Sertifikat Analisis Ofloksasin.....	48
Lampiran 9 Sertifikat Uji Biokimia Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	49

BAB I PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Masalah

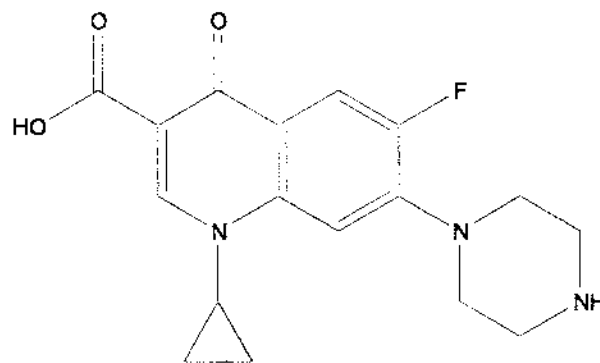
Sampai saat ini, infeksi masih merupakan penyakit utama di Negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Untuk memerangi penyakit infeksi ini pada umumnya digunakan obat-obatan, dalam hal ini kelompok obat yang paling sering dan terbanyak digunakan adalah antibakteri (Wattimena *et al.*, 1991). Mekanisme kerja antibakteri pada umumnya adalah menghambat biosintesis dinding sel, meninggikan permeabilitas membran sitoplasma dan mengganggu sintesis protein normal bakteri (Bonang dan Koeswardono, 1982).

Hingga saat ini pengembangan terhadap antibiotika dan senyawa antibakteri terus dilakukan. Salah satu antibakteri sintetik yang dikembangkan adalah turunan kuinolon yang efektif terhadap bakteri Gram negatif dan digunakan untuk infeksi saluran seni kronik maupun akut, infeksi saluran cerna, infeksi saluran nafas, infeksi pada tulang dan kulit (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

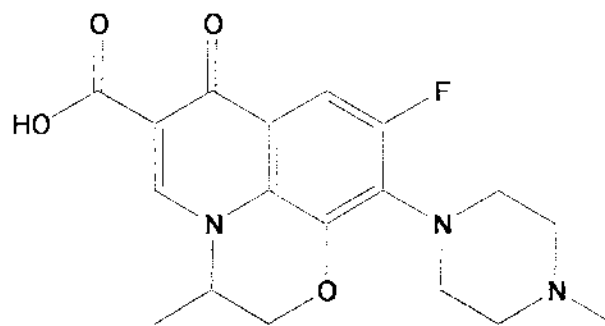
Pengembangan turunan tersebut diawali pada tahun 1980 dengan diperkenalkannya turunan 4-kuinolon baru dengan atom fluor pada posisi 6 cincin 4-kuinolon yang dinamakan fluorokuinolon. Perubahan struktur ini secara dramatis meningkatkan daya antibakteri, memperbaiki penyerapannya di saluran cerna serta memperpanjang masa kerja obat (Gan, 1995). Yang termasuk dalam golongan fluorokuinolon ini diantaranya adalah siprofloksasin, norfloksasin, ofloksasin, pefloksasin, amifloksasin, fleroksasin, akrosoksasin dan levofloksasin. Mekanisme kerja turunan 4-kuinolon adalah dengan menghambat secara selektif sintesis asam deoksiribose nukleat (DNA) bakteri dengan memblok sub unit A enzim DNA-girase, suatu tipe II topoisomerasi yang penting untuk replikasi dan transkripsi DNA bakteri sehingga bersifat bakterisidal (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Siprofloksasin dan ofloksasin dengan struktur dasar 4-kuinolon terfluoronisasi memiliki perbedaan gugus-gugus yang terikat pada atom karbon posisi 7 dan gugus pada atom nitrogen posisi 1. Pada siprofloksasin terdapat

cincin piperazin pada posisi 7 yang aktif sebagai antipseudomonas dan substitusi siklopropil pada nitrogen posisi 1 yang aktif sebagai antimikroba. Pada ofloksasin cincin piperazin pada posisi 7 termetilasi menjadi N-metil piperazin yang dapat meningkatkan bioavailabilitas pada penggunaan per oral dan gugus oksazin pada nitrogen di posisi 1 serta atom O pada posisi 8 akan menurunkan kecepatan metabolisme *in vivo* (McEvoy, 2002).



Gambar 1.1 Struktur Kimia Siprofloksasin



Gambar 1.2 Struktur Kimia Ofloksasin

Adanya perbedaan substitusi terhadap inti 4-fluorokuinolon tersebut di atas akan menyebabkan perubahan sifat fisikokimia dan reaktivitas kimianya yang juga akan berpengaruh terhadap proses distribusi dan perjalanan obat mencapai reseptor serta pola metabolisme dan ekskresi dari masing-masing obat. Oleh karena itu, pada penelitian ini perlu diketahui pengaruh perbedaan struktur siprofloksasin dan ofloksasin tersebut terhadap aktivitas biologisnya ditinjau dari sifat fisikokimia yang dapat dilakukan melalui pendekatan hubungan struktur dan aktivitas yang pengembangannya dipelopori oleh Corwin Hansch dkk pada tahun 1960. Mereka memelopori pendekatan hubungan struktur dan aktivitas melalui

sifat fisikokimia, yaitu: Sifat lipofilik, misalnya adalah logaritma koefisien partisi ($\log P$), tetapan f Rekker, tetapan π Hansch dan nilai R_m , sifat elektronik, misalnya adalah tetapan disosiasi (pK_a), tetapan σ Hammett dan tetapan σ^* Taft, sifat sterik, misalnya adalah tetapan E_s Taft, parakor $[P]$, refraksi molar (RM) dan tetapan E_s^c Hancock (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Sifat fisikokimia yang ditentukan adalah sifat lipofilik dalam hal ini R_m dan sifat sterik Refraksi Molar. R_m (*Retention modified*) adalah nilai lipofilisitas suatu senyawa yang ditetapkan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Fase Balik (KLTFB). Metode ini dipilih karena penggunaannya yang sudah cukup luas, pelaksanaannya sederhana dan cepat, serta mempunyai sensitivitas yang cukup tinggi (Sardjoko, 1993).

Refraksi Molar (RM), salah satu sifat sterik, merupakan sifat ruah (*bulk*) dan dapat diartikan sebagai sifat aditif konstitutif senyawa yang ukurannya mudah dan jelas (Sardjoko, 1993). Adanya perbedaan Refraksi Molar dapat menyebabkan perbedaan kemampuan interaksi obat-reseptor sehingga terjadi perbedaan aktivitas biologis yang ditimbulkan (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Ditinjau dari mekanisme kerja kedua senyawa (siprofloksasin dan ofloksasin) yaitu menghambat secara selektif DNA bakteri yang lebih berkaitan dengan ikatan obat-reseptor, maka sifat sterik memberikan peranan penting dalam besarnya aktivitas dibandingkan sifat elektronik, sehingga pada penelitian ini sifat elektronik (pK_a) senyawa tidak ditentukan (Gringauz, 1997).

Pada penelitian ini, penentuan uji aktivitas turunan fluorokuinon secara mikrobiologis akan dilakukan dengan metode dilusi cair atau yang lebih dikenal dengan metode Kadar Hambat Minimal. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan pertumbuhan mikroba dalam perbenihan cair oleh suatu obat yang dicampurkan dalam perbenihan. Kelebihan dari metode ini misalnya adalah dapat langsung diperoleh harga KHM dan mampu mengukur aktivitas dari senyawa aktif yang diuji dengan tidak bergantung pada kemampuan difusinya atau motilitasnya.

Penetapan potensi antibakteri harus digunakan mikroba yang peka untuk antibakteri yang diuji sehingga pengujian memberikan hasil yang baik (Wattimena, 1991). Pada penelitian ini digunakan *Pseudomonas aeruginosa*,

karena mikroba ini termasuk bakteri Gram negatif yang peka terhadap siprofloksasin dan ofloksasin (McEvoy, 2002). Selain itu bakteri ini merupakan Gram negatif yang paling sulit dibasmi dan bakteri ini telah direkomendasikan untuk penelitian di laboratorium (Bailey, 1974).

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Berapakah nilai sifat lipofilik (R_m) dan nilai sifat sterik (Refraksi Molar) dari siprofloksasin dan ofloksasin?
2. Berapakah aktivitas antibakteri siprofloksasin dan ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa*?
3. Bagaimanakah pengaruh perbedaan nilai sifat lipofilik (R_m) dan nilai sifat sterik (RM) dari siprofloksasin dan ofloksasin terhadap aktivitas antibakterinya pada *Pseudomonas aeruginosa*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Menentukan nilai sifat lipofilik (R_m) dan nilai sifat sterik (RM) dari siprofloksasin dan ofloksasin.
2. Menentukan aktivitas antibakteri (KHM) dari siprofloksasin dan ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Mengetahui pengaruh nilai sifat lipofilik (R_m) dan nilai sifat sterik (RM) dari siprofloksasin dan ofloksasin terhadap aktivitas antibakterinya pada *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi pelengkap informasi tentang senyawa siprofloksasin dan ofloksasin, sehingga nantinya dapat digunakan untuk pengembangan turunan senyawa dari kedua antibakteri tersebut menjadi senyawa obat baru yang memiliki aktivitas lebih besar.

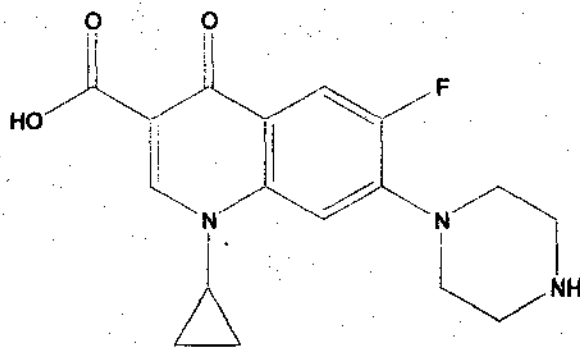
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Bahan Obat

a. Siprofloksasin (Budavari, 2001)



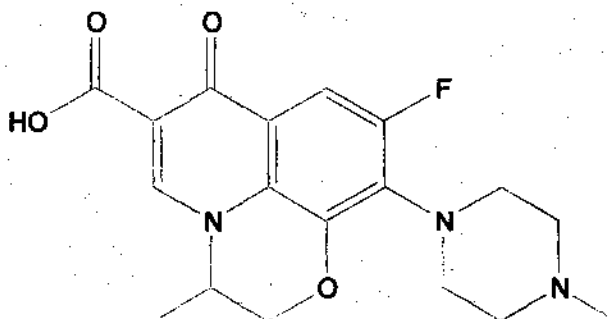
$C_{17}H_{18}FN_3O_3$, BM 331,34

Nama kimia: 1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid

Pemerian: serbuk kristal kuning, larut dalam 36 mg / ml air, pKa 6 dan 8,8 (McEvoy, 2002), MP 318 - 320°C.

Siprofloksasin merupakan antibakteri yang secara *in vitro* aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Digunakan untuk terapi infeksi secara luas termasuk diantaranya adalah untuk *bone and joint infection*, infeksi diare karena *Shigella* atau *Campylobacter*, infeksi kulit, infeksi traktus urinarius dan gonorrhoea (Parfitt, 2002). MIC siprofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* adalah 0,06-1µg/ml (Andriole, 1988)

b. Ofloksasin (Budavari, 2001)



$C_{18}H_{20}FN_3O_4$, BM 361,38

Nama kimia: 8-Fluoro-3-methyl-9-(4-methyl-piperazin-1-yl)-6-oxo-2,3-dihydro-6H-1-oxa-3aza-phenalene-5-carboxylic acid

Pemerian: serbuk kristal putih sampai kuning pucat, larut dalam air pada pH 2 – 5 (7,6 mg / mL), sedikit larut dalam air pada pH 7 (4 mg / mL) dan sangat larut dalam air pada pH diatas pH 9 (303 mg / mL), pKa 5,74 dan 7,9 (McEvoy, 2002), MP 250 - 257°C.

Ofloksasin merupakan antibakteri yang secara *in vitro* memiliki aktivitas kurang lebih sama dengan siprofloksasin, aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, digunakan juga untuk terapi *klamidia* termasuk *nongonococcal urethritis* dan terapi penyakit lepra (Parfitt, 2002). MIC ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* adalah 0,25-4 µg/ml (Andriole, 1988).

2.2 Tinjauan tentang Hubungan Struktur dan Aktivitas Biologis Ditinjau dari Segi Pendekatan Sifat Fisikokimia

Sifat fisikokimia suatu senyawa adalah sifat yang dapat diukur dengan cara apakah senyawa itu dapat berinteraksi dengan sistem lain. Respon biologis terhadap obat merupakan akibat dari interaksi obat itu dengan sistem kehidupan, menyebabkan beberapa perubahan pada proses biologi yang ada sebelum obat diberikan (Doerge, 1982).

Pendekatan hubungan struktur dan aktivitas biologis mulai berkembang dengan pesat setelah tahun 1960-an dengan dipelopori oleh Corwin Hansch dan kawan-kawan. Corwin Hansch dan kawan-kawan menghubungkan antara aktivitas biologis dan sifat yang menggambarkan perubahan sifat fisikokimia yaitu sifat hidrofobik, elektronik dan sterik pada suatu seri molekul (Siswandono dan Sockardjo, 1995).

2.2.1 Sifat Lipofilik

Sifat lipofilisitas adalah sifat kelarutan dalam fase lemak, yang ditentukan oleh banyaknya gugus yang bersifat lipofilik dan hidrofilik. Kelarutan dalam lemak merupakan sifat fisikokimia yang mempengaruhi

perjalanan obat melalui membran (Doerge, 1982). Nilai lipofilisitas yang tinggi menunjukkan senyawa lebih larut dalam lemak dibanding air. Senyawa dengan sifat lipofilik sangat tinggi, yaitu kelarutannya dalam air sangat rendah, tidak dapat menembus sawar hidrofilik dan terkumpul pada fase lemak. Sebaliknya, senyawa dengan sifat lipofilik yang rendah, jadi sangat sukar larut dalam lemak, tidak dapat menembus sawar lipofilik dan terkumpul pada fase air (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Sifat lipofilik yang sering digunakan dalam hubungan struktur dan aktivitas adalah (Siswandono dan Soekardjo, 1995):

1. Tetapan π Hansch

Tetapan π Hansch adalah suatu tetapan substituen hidrofobik yang didasarkan pada kelarutan dalam sistem oktanol-air.

2. Tetapan fragmentasi f Nys-Rekker

Tetapan fragmentasi f Nys-Rekker merupakan tetapan fragmentasi hidrofobik (f) dari gugus atau atom dalam suatu molekul yang dapat digunakan untuk menghitung Log P.

3. Logaritma koefisien partisi (Log P)

Koefisien partisi adalah tetapan kesetimbangan suatu senyawa dalam pelarut non polar dan pelarut polar, yang secara logaritma berhubungan dengan energi bebas. Koefisien partisi untuk bentuk molekul (tak terionkan) dihitung melalui persamaan:

$$P = C_o / C_w$$

Keterangan:

C_o = Kadar dalam pelarut minyak (pelarut non polar)

C_w = Kadar dalam air (pelarut polar)

4. Tetapan kromatografi R_m

Boyce dan Millborrow memperkenalkan sifat lain yang masih berhubungan dengan koefisien partisi yaitu sifat kromatografi R_m (*Retention modified*). R_m (*Retention modified*) adalah nilai lipofilisitas suatu senyawa yang ditetapkan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Fase Balik (KLTFB). Tetapan ini dinyatakan dengan persamaan (Siswandono dan Soekardjo, 1995):

$$R_m = \log (1 / R_f - 1) \quad \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh solven}}$$

R_m = modifikasi retardasi

Sedangkan hubungan nilai R_m dengan koefisien partisi diperoleh melalui persamaan :

$$\text{Log } P = \log K + R_m$$

Keterangan:

K = konstanta yang besarnya tergantung pada sistem kromatografi lapis tipis

Dari persamaan ini dapat diketahui adanya hubungan yang linier antara nilai R_m dengan $\text{Log } P$. Persamaan tersebut banyak digunakan untuk meneliti perubahan struktur dengan aktivitas biologis berdasarkan penentuan sifat lipofilisitasnya. Senyawa dengan lipofilisitas tinggi akan mempunyai nilai R_f yang kecil, sehingga senyawa dengan lipofilisitas yang rendah akan mempunyai nilai R_f tinggi, sehingga nilai R_m akan negatif (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

2.2.2 Sifat Elektronik

Sifat elektronik adalah sifat yang menyatakan kemampuan senyawa untuk terionisasi dalam berbagai lingkungan pH, kemampuan menarik/mendorong elektron atau menangkap/melepas proton dalam sistem redoks, sistem basa atau pembentukan kompleks. Sifat elektronik terutama berperan pada kemampuan senyawa menembus membran biologis (bentuk molekul) pada proses absorpsi pasif, distribusi antar kompartemen, proses metabolisme, interaksi molekul obat dengan reseptor dan proses ekskresi. Sifat elektronik yang sering digunakan adalah (Siswandono dan Soekardjo, 1995):

1. Tetapan σ Hammett
2. Tetapan σ^* Taft

3. Tetapan Dissosiasi (pKa)

2.2.3 Sifat Sterik

Sterik adalah sifat atau ukuran berat molekul dalam ruang. Sifat sterik sangat berperan pada proses interaksi molekul obat dengan reseptor. Sifat sterik yang sering digunakan adalah (Siswandono dan Soekardjo, 1995):

1. Tetapan E_s° Hancock

Tetapan E_s° Hancock diperkenalkan untuk mengoreksi tetapan E_s dari Taft karena adanya pengaruh dari hiperkonjugasi. Nilai tetapan sterik E_s° dan E_s tidak dapat diukur untuk banyak substituen karena model dasar reaksi yang tidak memungkinkan, sehingga daftar nilai tetapan sterik tersebut sangat terbatas.

2. E_s Taft

E_s Taft diperkenalkan berdasarkan fakta bahwa hidrolisis dalam suasana asam sangat ditentukan oleh faktor sterik dari gugus-gugus. Tetapan E_s adalah logaritma kecepatan hidrolisis yang dikatalisis oleh asam, pada kondisi pelarut, suhu, dan keasaman yang sama, dari ester $X-COOCH_3$ dibandingkan dengan metilasetat.

3. Parakor [P]

Parakor [P] adalah volume molar (V) yang telah dikoreksi dari kekuatan daya tarik intermolekul yaitu dengan mengalikannya dengan tegangan permukaan (γ)^{1/4} dan dikenal dengan sifat ruah.

4. Refraksi Molar (RM)

Refraksi molar adalah sifat aditif konstitutif senyawa yang ukurannya mudah dan jelas (Sardjoko, 1993). Tetapan ini dinyatakan melalui persamaan Lorenz-Lorentz sebagai berikut (Siswandono dan Soekardjo, 1995):

$$RM = (n^2 - 1) \times BM / (n^2 + 2) \times d \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

RM = Refraksi molar zat

n = indeks bias

d = densitas / masa jenis, diukur pada suhu yang sama dengan penentuan n

M = berat molekul zat

Refraksi molar untuk suatu zat padat ditentukan dengan cara melarutkan zat (solut) terlebih dahulu dalam solven, kemudian mengukur indeks bias serta densitas larutan. Refraksi molar larutan adalah (Maron, 1974):

$$R_{12} = \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \times \frac{(N_1 M_1 + N_2 M_2)}{d} \quad \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

- R_{12} = Refraksi molar larutan
 N_1 dan N_2 = fraksi molekul solven (1) dan solut (2) dalam larutan
 M_1 M_2 = berat molekul solven (1) dan solut (2)

Untuk menghitung refraksi molar zat (solut) dalam larutan yang digunakan persamaan:

$$R_{12} = N_1 R_1 + N_2 R_2 \quad \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

- R_1 dan R_2 masing-masing adalah refraksi molar solven (1) dan solut (2).

RM, salah satu sifat sterik, merupakan sifat ruah (*bulk*). Di sini diperkirakan efek sterik serupa dengan efek meruah, sehingga semakin besar nilai positif substituen, maka semakin besar pula efek steriknya. Dengan kata lain, semakin besar nilai RM senyawa maka semakin besar pula efek sterik yang dimilikinya, sehingga adanya perbedaan RM dapat menyebabkan perbedaan kemampuan interaksi obat – reseptor, akibatnya terjadi perbedaan aktivitas biologis yang ditimbulkan (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

2.3 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis Fase Balik

Kromatografi Lapis Tipis Fase Balik adalah kromatografi lapis tipis dengan fase diam adalah bahan yang bersifat lipofil atau non polar dan sebagai fase geraknya adalah cairan yang bersifat polar atau hidrofil. Disebut kromatografi lapis tipis fase balik karena pada kromatografi lapis tipis biasa fase diam pada dasarnya adalah bahan yang bersifat polar atau

hidrofil dan fase gerak bersifat kurang polar atau hidrofob (Rekker, 1997). Senyawa yang diselidiki cukup dalam jumlah mikron, dilarutkan dengan metanol dan ditotolkan mikropipet pada lempeng yang telah disiapkan untuk teknik kromatografi (Sardjoko, 1993).

Fase diam dari kromatografi lapis tipis fase balik biasa digunakan kieselgel yang di impregnasi dengan minyak silikon, parafin cair, atau oktanol yang dilarutkan dalam eter. Sedangkan sebagai fase gerak (eluen) pada umumnya adalah campuran dari pelarut organik yang dapat bercampur dengan air, seperti metanol atau aseton dengan perbandingan tertentu (v/v). Selanjutnya dilakukan prosedur seperti pada kromatografi lapis tipis biasa, eluasi dilakukan sampai fase gerak mencapai ketinggian tidak kurang dari 15cm dari titik penotolan. Setelah selesai eluasi, lempeng dikeringkan pada suhu 50-75°C, dan noda atau bercak dideteksi dengan menggunakan lampu UV atau dengan pereaksi kimia yang dapat memberikan warna dengan gugus fungsi senyawa (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Proses pemisahan yang terjadi pada kromatografi lapis tipis fase balik adalah proses partisi antara fase diam dan fase gerak. Fase diam berfungsi sebagai penghambat dan fase gerak sebagai pembawa solut yang bergerak sepanjang fase diam dengan kecepatan yang konstan. Keuntungan dari penggunaan metode kromatografi lapis tipis fase balik yaitu (Sardjoko, 1993):

- a. Bahan yang diperlukan relatif sedikit
- b. Cara pelaksanaanya cepat
- c. Dapat untuk menentukan senyawa dengan nilai log P yang sangat tinggi atau rendah

2.4 Tinjauan tentang Aktivitas Antibakteri secara Mikrobiologis

Penentuan aktivitas antibiotika secara *in vitro* berguna untuk menguji kepekaan suatu mikroba terhadap antibiotika. Kepekaan antimikroba terhadap antibiotika dapat dilihat dari konsentrasi minimum untuk hambatan oleh suatu antibiotika terhadap mikroba tertentu. Konsentrasi terendah antibiotika menghambat pertumbuhan bakteri

dinyatakan sebagai konsentrasi hambatan minimum (Wattimena *et al.*, 1991).

Pengujian aktivitas antibiotika didasarkan pada kemampuan menumbuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme hidup. Keberhasilan dalam uji aktivitas tidak hanya bergantung pada senyawa antibiotika saja tetapi juga tergantung pada spesifikasi bakteri uji. Metode yang digunakan dibagi menjadi dua metode yaitu metode dilusi dan metode difusi (Pelczar, 1986).

2.4.1 Metode Dilusi

Prinsip metode dilusi adalah suatu seri pengenceran larutan antibiotika dalam media pertumbuhan baik konsentrasi cair atau padat jumlah tertentu ditanam dalam media, setelah diinkubasi akan terlihat hambatan pertumbuhan bakteri. Metode dilusi dapat menentukan konsentrasi hambat minimal atau konsentrasi bunuh minimal (Edberg, 1986).

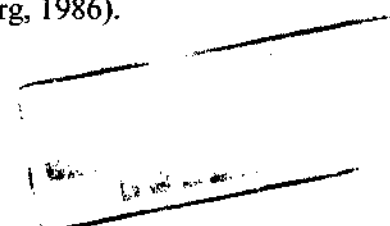
Berdasarkan media yang digunakan, metode dilusi dibedakan menjadi metode dilusi cair dan dilusi padat.

a. Metode dilusi cair

Suatu seri tabung berisi media cair masing-masing mengandung antibiotika dengan konsentrasi yang berbeda. Isolat kuman diinokulasi ke dalam setiap tabung dan di kontrol. Setelah inkubasi, hambatan pertumbuhan dapat dilihat dengan mengamati kekeruhan pada masing-masing tabung. Konsentrasi terendah yang memperlihatkan penghambatan pertumbuhan bakteri dianggap konsentrasi penghambatan minimum (Edberg, 1986).

b. Metode dilusi padat

Antimikroba dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam lempengan agar padat yang berlainan. Isolat kuman yang berlainan ditempatkan pada permukaan agar dan diinkubasi. Bila mikroorganisme resisten terhadap konsentrasi antibiotika yang diuji, maka mikroba akan tumbuh dan terlihat suatu koloni pertumbuhan bakteri (Edberg, 1986).



2.4.2 Metode Difusi

Metode ini berdasarkan pada difusi antibakteri dari pencadang ke dalam media yang telah mengandung mikroorganisme yang diuji. Pengaruh dari antibakteri tampak dengan adanya daerah jernih dan daerah keruh di sekeliling pencadang. Daerah jernih menunjukkan daerah terjadinya hambatan pertumbuhan bakteri dan diameternya disebut diameter daerah hambatan. Besarnya diameter daerah hambatan sebanding dengan kadar antibakteri dalam pencadang. Faktor yang mempengaruhi ukuran diameter daerah hambatan adalah sensitivitas bakteri, aktivitas antibakteri, komposisi media, ketebalan media dalam lempeng, temperatur dan waktu inkubasi serta laju difusi antibakteri. Semakin besar diameter daerah hambatan, maka semakin besar aktivitas senyawa yang diuji terhadap bakteri (Bailey, 1974).

Berdasarkan pencadang yang digunakan metode difusi dapat dibedakan menjadi tiga yaitu metode difusi cakram, difusi silinder, dan cetak lubang.

a. Metode difusi cakram

Metode difusi cakram menggunakan kertas pencadang. Kertas pencadang dijenuhkan dengan larutan antibiotika dan diletakkan pada permukaan agar. Karena variabilitas produk kertas maka kandungan antibiotika tidak dapat diperkirakan dengan tepat.

b. Metode difusi silinder

Pencadang yang digunakan adalah silinder logam atau gelas yang berisi larutan antibiotika dengan kadar tertentu. Lempeng agar diinkubasi, potensi dari daya hambat antibiotika yang diuji sebanding dengan lebar diameter daerah hambatan disekitar silinder.

c. Metode cetak lubang

Metode cetak lubang menggunakan sebagai pencadang. Lubang yang terbentuk dengan diameter 4-8 mm diisi dengan antibiotika dengan kadar tertentu.

Sebagai metode terpilih untuk menentukan aktivitas siprofloksasin dan ofloksasin adalah metode pengenceran tabung, atau yang lebih dikenal dengan metode dilusi cair atau Metode Konsentrasi Hambat Minimal.

2.5 Tinjauan tentang *Pseudomonas aeruginosa*

2.5.1 Morfologi

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram negatif yang bergerak, berbentuk batang, panjangnya bervariasi antara 2-4 μm , bergerak aktif, dapat berupa bakteri tunggal, berpasangan atau kadang-kadang berbentuk rantai pendek, menghasilkan pigmen yang larut dalam air dan berdifusi dalam perbenihan. Mempunyai sebuah *flagella* namun ada juga yang mempunyai 2-3 *flagella*. Bakteri ini bersifat aerob obligat dan banyak ditemukan dalam tanah, air, sampah dan udara. *Pseudomonas aeruginosa* sering ditemukan dalam jumlah kecil pada flora normal usus dan kulit pada manusia (Jawetz, 1995).

2.5.2 Kultur dan Biakan

Pseudomonas aeruginosa mudah tumbuh pada berbagai media, dapat menghasilkan bau seperti anggur dan beberapa strain dapat menyebabkan hemolisa darah. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni bulat halus dengan warna hijau berfluoresensi dan menghasilkan pigmen *pyocyanin* dan pigmen ini mudah terdispersi dalam media agar. Dalam media mikroorganisme ini dapat menghasilkan berbagai tipe koloni, sehingga mempunyai sifat biokimia dan aktivitas enzim yang berbeda terhadap senyawa antibiotika (Jawetz, 1995).

2.5.3 Sifat Pertumbuhan

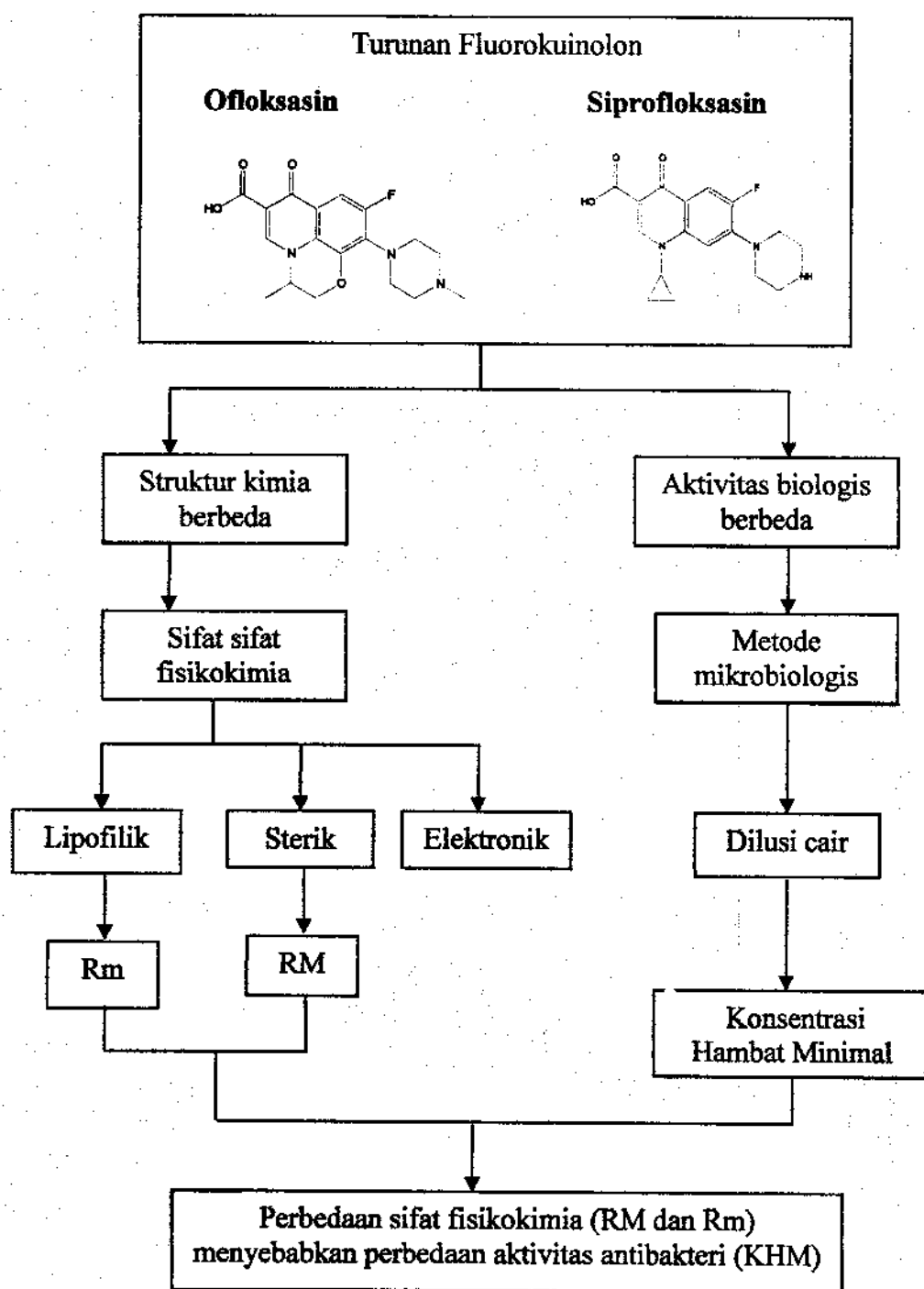
Pseudomonas aeruginosa tumbuh baik pada suhu 37-42 °C. Pertumbuhan pada suhu 42 °C membantu membedakan *Pseudomonas aeruginosa* dengan spesies *Pseudomonas* lainnya. Energi yang diperoleh berasal dari hasil oksidasi karbohidrat bukan dari hasil fermentasi karbohidrat, beberapa strain lain mendapat energi dari oksidasi glukosa (Jawetz, 1995).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Perkembangan antibiotika terus dilakukan, salah satunya adalah terhadap turunan kuinolon yang efektif terhadap bakteri Gram negatif. Salah satu upaya pengembangannya adalah dengan diperkenalkannya turunan 4-kuinolon baru yaitu fluorokuinolon yang memiliki atom fluor pada posisi 6 (Gan, 1995). Dua diantara golongan fluorokuinolon ini adalah siprofloksasin dan ofloksasin, dimana keduanya memiliki perbedaan gugus-gugus yang terikat pada atom karbon posisi 7 serta gugus pada atom nitrogen posisi 1 (Mc Evoy, 2002).

Adanya perbedaan substitusi terhadap inti 4-fluorokuinolon tersebut di atas akan menyebabkan perubahan sifat fisikokimia dan reaktivitas kimianya yang juga akan berpengaruh terhadap proses distribusi dan perjalanan obat mencapai reseptor serta pola metabolisme dan ekskresi dari masing-masing obat. Oleh karena itu, pada penelitian ini perlu diketahui hubungan antara sifat fisikokimia siprofloksasin dan ofloksasin dengan aktivitas biologisnya pada *Pseudomonas aeruginosa* melalui pendekatan hubungan struktur dan aktivitas (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Sifat fisikokimia yang ditetapkan adalah sifat lipofik Rm dan sifat sterik RM. Sedangkan penentuan uji aktivitasnya dilakukan terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode dilusi cair atau lebih dikenal dengan metode Kadar Hambat Minimal.



Gambar 3.1

Skema Kerangka Konseptual

BAB IV BAHAN, PERALATAN DAN METODE PENELITIAN

4.1 Bahan

Siprofloksasin *Pharmaceutical Grade* (Xinhua Pharma Chemical), Ofloksasin *Pharmaceutical Grade* (Hengdian Group), Air suling, Metanol p.a (E.Merck), Aseton p.a (E.Merck), Mueller Hinton Broth (Difco), Larutan Natrium Klorida isotonis steril (Otsuka), Media Mueller Hinton Agar (Difco), Bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya), Lempeng Kieselgel 60F-254

4.2 Alat-alat

Neraca analitis Adventurer Ohaus (AR 3130,2140), Electrothermal Melting Point Apparatus (Melt-Temp Type FU8E), Inkubator (Mettler), Autoklaf (Huxley HL-340 speedy), Laminar Air Flow (Dalton), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), Lampu UV λ 254nm, 366nm (seri 950340), Refraktometer Abbe, Piknometer, Bejana kromatografi (Camag)

4.3 Metode penelitian

4.3.1 Analisis Kualitatif terhadap Bahan Penelitian (Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan air panas, kemudian dikeringkan dengan kain yang tidak berbulu, dilidhapikan sampai hangat dan didinginkan. Suspensi kuman dalam air suling steril pada gelas obyek dikeringkan diudara dan difiksir dengan cara melewatkan gelas obyek diatas api lampu spiritus beberapa kali. Larutan zat kristal ungu dituang pada gelas obyek dan biarkan 1 menit. Sisa larutan zat warna kristal ungu di buang dan diganti dengan larutan lugol, biarkan 1 menit, cuci dengan air suling. Warna yang terbentuk dihilangkan dengan alkohol 95% selama 10-20 menit sambil digoyang-goyang sampai tidak terdapat zat warna yang mengalir diatas sediaan, cuci dengan air suling .

Kemudian ditambahkan larutan safranin dan biarkan 10-30 menit, bilas dengan air dan biarkan kering, kemudian amati dibawah mikroskop (Jawetz, 1995).

Cara identifikasi yang lain adalah dengan tes sifat pertumbuhan pada media Mueller Hinton Agar, *Pseudomonas aeruginosa* akan membuat warna hijau berfluoresensi dan menimbulkan bau aromatic (Jawetz, 1995).

4.3.2 Penentuan Sifat Rm

a. Impregnasi Lempeng Kromatografi

Lempeng kromatografi dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sudah dijenuhkan dengan larutan 5% n-oktanol dalam eter, kemudian lempeng dieluasi dan ditunggu sampai larutan impregnasi melapisi seluruh permukaan lempeng kromatografi, diambil dan diangin-anginkan, setelah itu baru dapat dilakukan penotolan pada lempeng kromatografi tersebut.

b. Pelaksanaan Penentuan Rm

i. Penjenuhan Bejana Kromatografi

Dibuat campuran eluen metanol-air pada berbagai perbandingan, yaitu metanol:air 5:5, 6:4, 7:3, 8:2. Eluen dimasukkan ke dalam bejana dan dibiarkan hingga sistem mencapai keseimbangan atau kertas saring terbasahi seluruhnya.

ii. Proses Eluasi dan Penentuan Nilai Rm

Siprofloksasin dan ofloksasin masing-masing ditimbang sejumlah 50,0 mg kemudian dilarutkan dalam metanol sampai volume 35,0 ml. Lempeng kromatografi yang sudah diimpregnasi diberi tanda sehingga titik penotolan lebih kurang 2 cm dari bawah lempeng dan jarak eluasi 15 cm. Larutan antibakteri (siprofloksasin dan ofloksasin) masing-masing ditotolkan pada lempeng kromatografi dengan menggunakan pipa kapiler sebanyak 2 μ l. Setelah mengering, lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sudah dijenuhkan. Diamkan hingga fase gerak mencapai ketinggian yang ditentukan. Lempeng diambil dan dikeringkan, kemudian setelah kering dilihat nodanya dibawah lampu UV.

Jarak noda dari tempat penotolan diukur dan ditentukan nilai R_f nya. Kemudian nilai R_m dapat diperoleh melalui persamaan (1) (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Percobaan dilakukan dengan replikasi tiga kali.

4.3.3 Penentuan Refraksi Molar (RM)

Seluruh pengukuran dilakukan pada suhu 30°C , oleh karena itu terlebih dahulu ditentukan volume piknometer pada suhu 30°C dengan menggunakan densitas air pada suhu 30°C (diambil dari pustaka). Selanjutnya dibuat larutan senyawa antibakteri dalam metanol dengan konsentrasi tertentu yaitu $\pm 0,1500\% \text{b/v}$. Kemudian ditentukan densitas larutan (d) dengan piknometer dan catat suhu pengamatan ditentukan pula indeks bias larutan (n). Menentukan densitas metanol (d) dan indeks biasnya (n) pada suhu yang sama. Dihitung refraksi molar (R_{12}) dengan rumus (3), refraksi molar solven (R_1) menggunakan rumus (2) serta fraksi mol solven (N_1) dan solut (N_2) dan menentukan refraksi molar senyawa (R_2) dengan menggunakan rumus (4).

Pada setiap senyawa dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

4.3.4 Penetapan Kadar Hambat Minimal Larutan Uji terhadap Bakteri

Pseudomonas aruginosa

a. Penyiapan inokulum bakteri *Pseudomonas aruginosa*

Biakan *Pseudomonas aruginosa* ditanam pada permukaan Muller Hinton agar miring secara merata, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi diambil beberapa goresan ose koloni dari permukaan media dan disuspensikan ke dalam larutan natrium klorida isotonis dan dikocok homogen.

Serapan suspensi mikroba diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 580 nm sedemikian rupa sehingga dengan pengenceran tertentu diperoleh transmittan 25% terhadap blanko larutan NaCl isotonis.

b. Penentuan Kadar Hambat Minimal

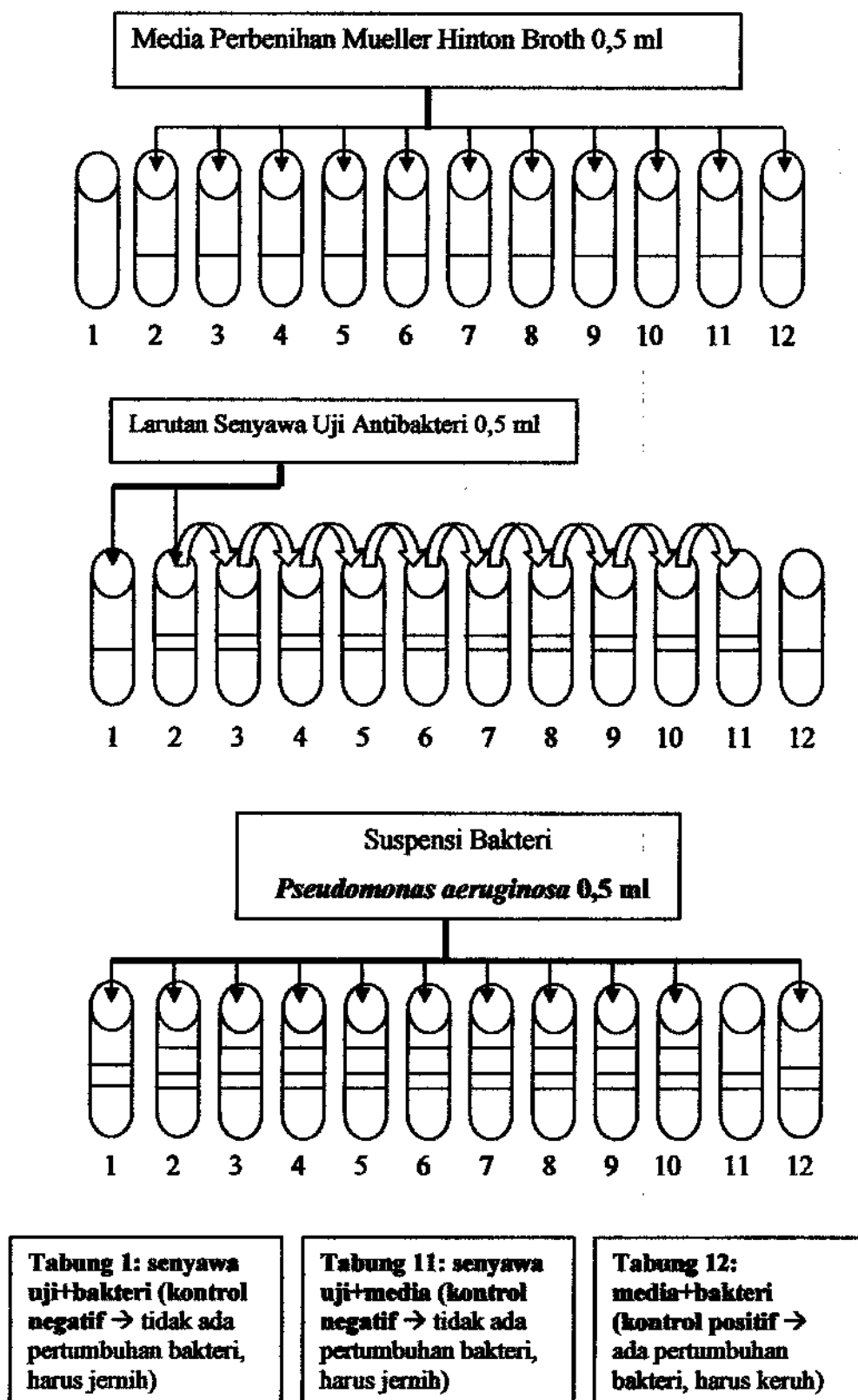
Dalam menentukan kadar hambat minimal, media perbenihan yang dipakai harus merupakan perbenihan yang dapat menumbuhkan kuman secara optimum dan tidak menetralkan senyawa uji. Media yang digunakan yaitu Mueller Hinton Broth karena merupakan perbenihan yang baik untuk bermacam – macam bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Masing-masing senyawa uji antibakteri dilakukan penentuan KHM sebagai berikut:

Pembuatan larutan sampel induk siprofloksasin dengan konsentrasi $8\mu\text{g/ml}$ dan sampel induk ofloksasin dengan konsentrasi $20\ \mu\text{g/ml}$. Tes dilakukan dengan mempergunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung dengan interval pengenceran 2 kali. Secara aseptik dimasukkan $0,5\ \text{ml}$ perbenihan cair yang akan dipergunakan ke dalam tiap tabung, kecuali pada tabung pertama. Ke dalam tabung pertama dan ke dua ditambahkan $0,5\ \text{ml}$ larutan sampel induk, kocok dan dipindahkan $0,5\ \text{ml}$ dari tabung ke dua ke tabung ketiga. Dilakukan dengan cara yang sama dari tabung ketiga dan seterusnya sampai tabung kesebelas. Ditambahkan $0,5\ \text{ml}$ suspensi bakteri yang telah diukur transmittannya 25% pada $\lambda\ 580\ \text{nm}$ ke dalam tabung pertama sampai tabung kedua belas kecuali pada tabung kesebelas. Tabung pertama berisi larutan senyawa uji dan suspensi bakteri, sehingga berfungsi sebagai kontrol negatif yaitu tidak boleh ada pertumbuhan bakteri di dalam tabung, yang ditunjukkan keadaan larutan dalam tabung yang tetap jernih. Tabung kesebelas berisi media perbenihan cair dan larutan senyawa uji, sehingga berfungsi sebagai kontrol negatif karena tidak dimasukkan bakteri ke dalamnya, ditandai dengan keadaan larutan dalam tabung yang tetap jernih. Tabung keduabelas berisi media perbenihan cair dan suspensi bakteri, sehingga berfungsi sebagai kontrol positif yaitu harus ada pertumbuhan bakteri di dalam tabung yang ditunjukkan dengan terjadinya kekeruhan. Semua tabung diinkubasi pada suhu $37\ ^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Amati tabung dengan pengenceran tertinggi yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan atau pertumbuhan. Konsentrasi tabung inilah yang dinamakan sebagai kadar hambat minimal. Interval pengenceran dapat

dibuat lebih lebih sempit agar didapatkan hasil yang lebih teliti. Pada setiap senyawa uji dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

Kadar hambat minimal adalah pengenceran tertinggi dari senyawa aktif yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan secara makroskopik. Apabila pada pengamatan ada beberapa tabung yang tetap jernih dan tabung-tabung yang tampak keruh (bandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif), maka tabung dengan kadar senyawa aktif terendah yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri di catat sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM).



Gambar 4.1 Skema Pelaksanaan Uji Antibakteri dengan Metode Konsentrasi Hambat Minimal

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Pemeriksaan Kualitatif terhadap Bahan Obat

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan kualitatif terhadap bahan obat (siprofloksasin dan ofloksasin) karena telah ada Certificate of Analysis yang dikeluarkan oleh pabrik (Xinhua Pharma Chemical dan Hengdian Group). Certificate of Analysis dari siprofloksasin dan ofloksasin dapat dilihat pada lampiran 7 dan 8.

5.2 Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pada penelitian ini, hanya dilakukan uji sifat pertumbuhan pada media Mueller Hinton Agar, *Pseudomonas aeruginosa* akan membuat warna hijau berfluoresensi seperti tampak pada gambar dibawah 5.1. Uji identifikasi yang lain tercantum dalam Hasil Uji Biokimia yang dikeluarkan oleh Balai Basar Laboratorium Kesehatan Surabaya (lampiran 9)



Gambar 5.1 Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada Mueller Hinton Agar

5.3 Penentuan Nilai Rm

5.3.1 Penentuan Nilai Rm Sipprofloksasin

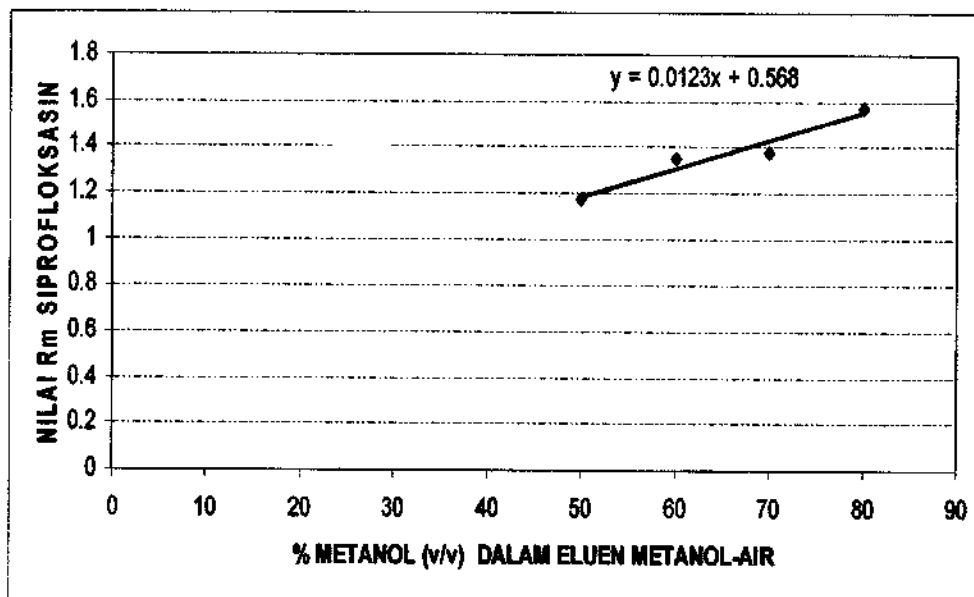
Hasil percobaan KLT fase balik yang dilakukan dengan eluen campuran metanol-air dengan beberapa perbandingan, diperoleh harga Rf sipprofloksasin seperti yang tertera pada tabel V.1.

Tabel V.1
Nilai Rm sipprofloksasin dengan eluen metanol-air

Metanol:Air (v/v)	Jarak noda* (cm)	Rf	1/Rf - 1	Rm = log (1/Rf - 1)	Rm rata-rata
5:5	0,50	0,06	15,67	1,19	1,17
	0,55	0,07	13,28	1,12	
	0,50	0,06	15,67	1,19	
6:4	0,30	0,04	24,00	1,38	1,35
	0,35	0,04	24,00	1,38	
	0,40	0,05	19,00	1,28	
7:3	0,30	0,04	24,00	1,38	1,38
	0,30	0,04	24,00	1,38	
	0,30	0,04	24,00	1,38	
8:2	0,20	0,02	49,00	1,69	1,57
	0,25	0,03	32,33	1,51	
	0,25	0,03	32,33	1,51	

*Jarak eluasi = 8,00 cm

Untuk mengetahui nilai Rm sipprofloksasin dengan eluen air 100% yang lebih menggambarkan nilai Rm sipprofloksasin dalam sistem oktanol-air, maka dari data di atas dibuat grafik persamaan regresi antara % metanol (v/v) dalam eluen dengan nilai Rm sipprofloksasin yang dapat dilihat pada gambar 5.2



Gambar 5.2 Kurva Hubungan Antara % Metanol (v/v) dalam Eluen dengan Nilai Rm Siprofloksasin

Harga r hitung dari kurva di atas adalah 0,9695 dan harga r_{tabel} pada $\alpha=0,05$ dan $dB=2$ adalah 0,9500 sehingga $r_{\text{hitung}} > r_{\text{tabel}}$. Hal tersebut di atas memperlihatkan bahwa ada korelasi yang linier antara variabel x (% metanol 'v/v' dalam eluen) dan variabel y (nilai Rm siprofloksasin). Berdasarkan persamaan tersebut di atas dapat dihitung nilai Rm siprofloksasin dalam sistem oktanol-air yaitu sebesar 0,568 (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 1).

5.3.2 Penentuan Nilai R_m Ofloksasin

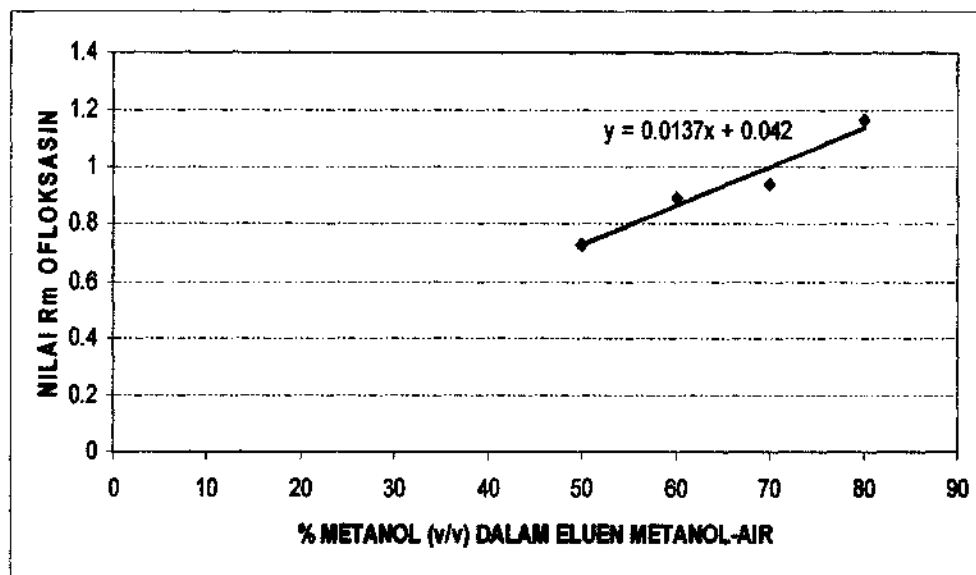
Hasil percobaan KLT fase balik yang dilakukan dengan eluen campuran metanol-air dengan beberapa perbandingan, diperoleh harga R_f ofloksasin seperti yang tertera pada tabel V.2 dibawah ini.

Tabel V.2
Nilai R_m ofloksasin dengan eluen metanol-air

Metanol:Air (v/v)	Jarak noda* (cm)	R _f	1/R _f - 1	R _m = log (1/R _f - 1)	R _m rata-rata
5:5	1,25	0,16	5,25	0,72	0,73
	1,30	0,16	5,25	0,72	
	1,20	0,15	5,67	0,75	
6:4	0,95	0,12	7,33	0,86	0,89
	0,90	0,11	8,09	0,91	
	0,90	0,11	8,09	0,91	
7:3	0,85	0,10	9,00	0,95	0,94
	0,80	0,10	9,00	0,95	
	0,90	0,11	8,09	0,91	
8:2	0,60	0,07	13,28	1,12	1,17
	0,50	0,06	15,67	1,19	
	0,50	0,06	15,67	1,19	

*Jarak eluasi = 8,00 cm

Untuk mengetahui nilai R_m ofloksasin dengan eluen air 100% yang lebih menggambarkan nilai R_m ofloksasin dalam sistem oktanol-air, maka dari data di atas dibuat grafik persamaan regresi antara % metanol (v/v) dalam eluen dengan nilai R_m ofloksasin yang dapat dilihat pada gambar 5.3



Gambar 5.3 Kurva Hubungan Antara % Metanol (v/v) dalam Eluen dengan Nilai Rm Ofloksasin

Harga r hitung dari kurva di atas adalah 0,9723 dan harga r_{tabel} pada $\alpha=0,05$ dan $dB=2$ adalah 0,9500 sehingga $r_{\text{hitung}} > r_{\text{tabel}}$. Hal tersebut di atas memperlihatkan bahwa ada korelasi yang linier antara variabel x (% metanol 'v/v' dalam eluen) dan variabel y (nilai Rm ofloksasin). Berdasarkan persamaan tersebut di atas dapat dihitung nilai Rm ofloksasin dalam sistem oktanol-air yaitu sebesar 0,042 (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 2).

Dari uraian pada sub bab 5.3.1 dan 5.3.2 tersebut diperoleh nilai Rm senyawa siprofloksasin dan ofloksasin adalah sebagai berikut:

Tabel V.3

Nilai Rm siprofloksasin dan ofloksasin

No	senyawa	Rm
1	siprofloksasin	0,568
2	ofloksasin	0,042



Gambar 5.4 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 50 % v/v



Gambar 5.5 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 60 % v/v



Gambar 5.6 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 70 % v/v



Gambar 5.7 Hasil KLT Fase Balik Siprofloksasin dan Ofloksasin dengan Eluen Metanol-Air pada Konsentrasi Metanol 80 % v/v

5.4 Penentuan Nilai Refraksi Molar Senyawa Uji

5.4.1 Penentuan Nilai Refraksi Molar Metanol

Untuk menentukan nilai Refraksi Molar metanol perlu ditetapkan nilai densitas dan indeks bias metanol pada suhu 30° C. Hasil penentuan indeks bias, densitas dan Refraksi Molar metanol dapat dilihat pada tabel V.4, sedangkan untuk perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel V.4
Hasil penentuan Refraksi Molar metanol pada suhu 30° C

No.	Densitas metanol (g/cc)	Indeks bias metanol	Refraksi Molar metanol (cc/mol)
1	0,7848	1,3263	8,24
2	0,7847	1,3262	8,24
3	0,7844	1,3262	8,24
Refraksi Molar metanol rata-rata			$8,25 \pm 2,3 \times 10^{-3}$

5.4.2 Penentuan Nilai Refraksi Molar Siprofloksasin

Nilai Refraksi Molar siprofloksasin dihitung berdasarkan nilai Refraksi Molar larutan zat dalam metanol pada suhu 30° C. Hasil penentuan indeks bias larutan zat dalam metanol, densitas larutan zat dalam metanol dan Refraksi Molar siprofloksasin dapat dilihat pada tabel V.5, sedangkan untuk perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel V.5
Hasil penentuan Refraksi Molar siprofloksasin pada suhu 30° C

No.	Massa zat (g)	Fraksi mol zat	Fraksi mol metanol	Densitas larutan (g/cc)	Indeks bias larutan	Refraksi Molar larutan (cc/mol)	Refraksi Molar zat (cc/mol)
1	0,1035	$1,8 \times 10^{-4}$	0,9998	0,7827	1,3264	8,28	210,34
2	0,1021	$1,8 \times 10^{-4}$	0,9998	0,7827	1,3265	8,28	224,19
3	0,1020	$1,8 \times 10^{-4}$	0,9998	0,7827	1,3264	8,28	212,70
Refraksi Molar siprofloksasin rata-rata							215,75±7,41

5.4.3 Penentuan Nilai Refraksi Molar Ofloksasin

Nilai Refraksi Molar ofloksasin dihitung berdasarkan nilai Refraksi Molar larutan zat dalam metanol pada suhu 30°C. Hasil penentuan indeks bias larutan zat dalam metanol, densitas larutan zat dalam metanol dan Refraksi Molar ofloksasin dapat dilihat pada tabel V.6, sedangkan untuk perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel V.6
Hasil penentuan Refraksi Molar ofloksasin pada suhu 30° C

No.	Massa zat (g)	Fraksi mol zat	Fraksi mol metanol	Densitas larutan (g/cc)	Indeks bias larutan	Refraksi Molar larutan (cc/mol)	Refraksi Molar zat (cc/mol)
1	0,1066	$1,7 \times 10^{-4}$	0,9998	0,7832	1,3271	8,29	284,87
2	0,1037	$1,7 \times 10^{-4}$	0,9998	0,7823	1,3267	8,29	294,60
3	0,1030	$1,7 \times 10^{-4}$	0,9998	0,7822	1,3266	8,29	287,75
Refraksi Molar ofloksasin rata-rata							289,43±4,99

5.5 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal

Dalam penentuan aktivitas antibakteri siprofloksasin dan ofloksasin digunakan media Mueller Hinton Broth, suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dalam larutan NaCl isotonis dengan transmittan 25% dan larutan senyawa siprofloksasin dan ofloksasin dengan konsentrasi tertentu. Hasil uji aktivitas siprofloksasin dan ofloksasin dapat dilihat pada tabel V.7 dan tabel V.8 serta pada gambar 5.8 dan 5.9.

Tabel V.7
Hasil uji aktivitas siprofloksasin terhadap
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

No. tabung	Replikasi I		Replikasi II		Replikasi III	
	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	P	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	P	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	P
1	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-
2	4,16	-	4,22	-	4,16	-
3	2,08	-	2,11	-	2,08	-
4	1,04	-	1,06	-	1,04	-
5	0,52	+	0,53	+	0,52	+
6	0,26	+	0,26	+	0,26	+
7	0,13	+	0,13	+	0,13	+
8	0,07	+	0,07	+	0,07	+
9	0,03	+	0,03	+	0,03	+
10	0,02	+	0,02	+	0,02	+
11	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-
12	kontrol (+)	+	kontrol (+)	+	kontrol (+)	+

Keterangan :

P = Pertumbuhan bakteri (pengamatan visual)

(+) = terjadi pertumbuhan (keruh/hijau)

(-) = tidak terjadi pertumbuhan (jernih)

□ = KHM (pengenceran tertinggi yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri)

Dari tabel di atas, dapat diketahui bahwa aktivitas antibakteri (KHM) siprofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah sebesar 1,00 $\mu\text{g/ml}$ (pada tabung no.4)

Tabel V.8
Hasil uji aktivitas ofloksasin terhadap
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

No. tabung	Replikasi I		Replikasi II		Replikasi III	
	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	P	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	P	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	P
1	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-
2	10,60	-	10,66	-	10,58	-
3	5,30	+	5,33	+	5,29	+
4	2,65	+	2,66	+	2,64	+
5	1,32	+	1,33	+	1,32	+
6	0,66	+	0,67	+	0,66	+
7	0,33	+	0,33	+	0,33	+
8	0,16	+	0,17	+	0,16	+
9	0,08	+	0,08	+	0,08	+
10	0,04	+	0,04	+	0,04	+
11	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-	kontrol (-)	-
12	kontrol (+)	+	kontrol (+)	+	kontrol (+)	+

Keterangan :

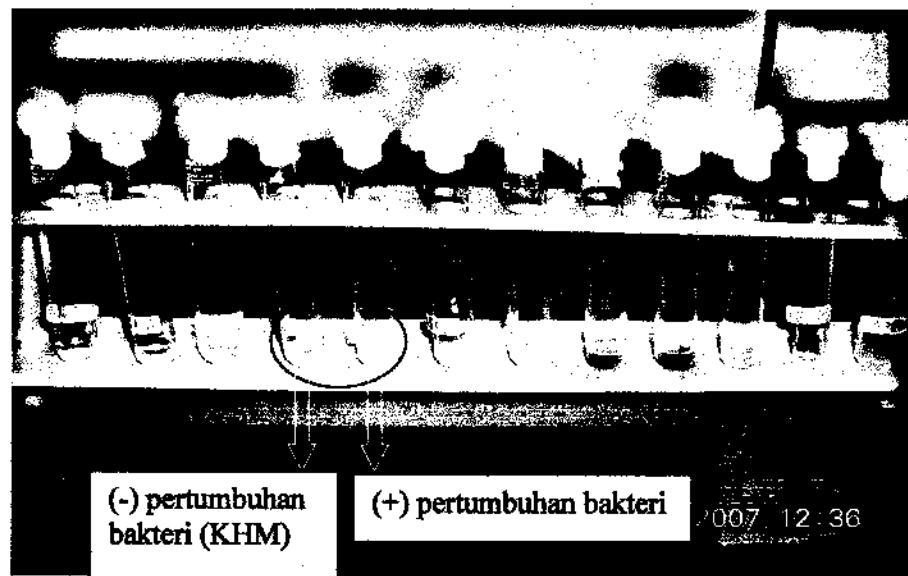
P = Pertumbuhan bakteri (pengamatan visual)

(+) = terjadi pertumbuhan (keruh/hijau)

(-) = tidak terjadi pertumbuhan (jernih)

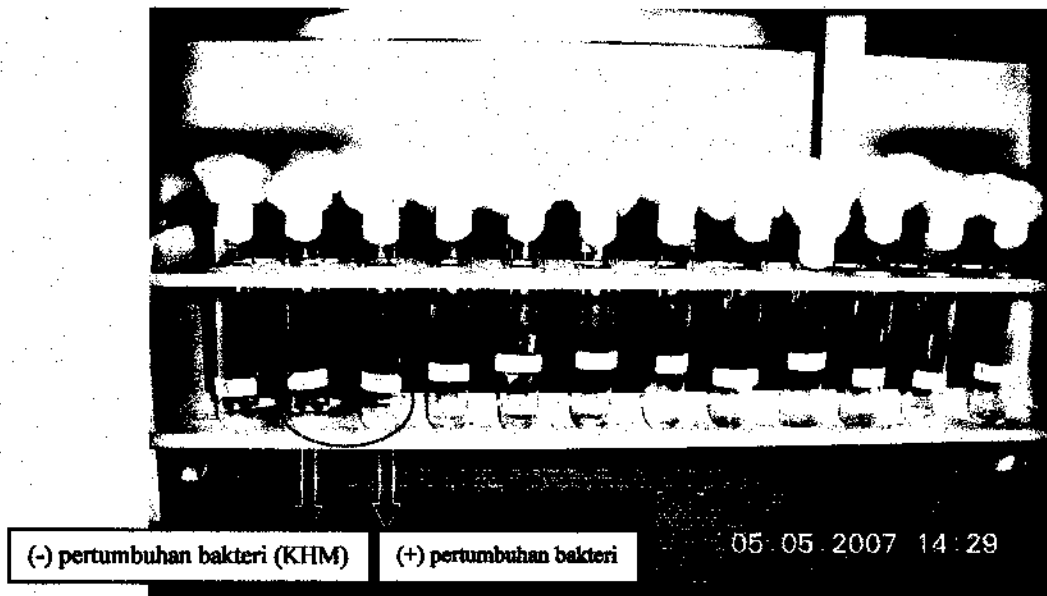
☐ = KHM (pengenceran tertinggi yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri)

Dari tabel di atas, dapat diketahui bahwa aktivitas antibakteri (KHM) ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah sebesar 10,00 $\mu\text{g/ml}$ (pada tabung no.2)



Gambar 5.8 Hasil Uji Aktivitas Siprofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Dari gambar di atas, diketahui bahwa aktivitas antibakteri (KHM) siprofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah pada tabung no.4 (1,00 $\mu\text{g/ml}$).



Gambar 5.9 Hasil Uji Aktivitas Ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Dari gambar di atas, diketahui bahwa aktivitas antibakteri (KHM) ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah pada tabung no.2 (10,00 $\mu\text{g/ml}$).

BAB VI PEMBAHASAN

Turunan 4-kuinolon merupakan salah satu antibakteri sintetik yang penggunaannya cukup luas untuk kepentingan medis terutama untuk pengobatan infeksi bakteri Gram negatif. Dipilih antibakteri siprofloksasin dan ofloksasin dari golongan 4-kuinolon tersebut karena kedua antibakteri ini memiliki keunikan sifat, yaitu sama-sama memiliki efek penghambatan terhadap bakteri yang lebih cepat dibandingkan dengan senyawa dari golongan 4-kuinolon. Adanya perbedaan substituen pada inti 4-kuinolon dari siprofloksasin dan ofloksasin akan menyebabkan perbedaan sifat fisikokimia dan reaktivitas kimianya yang juga akan berpengaruh pada aktivitas biologisnya.

Sifat fisikokimia antara lain digambarkan melalui sifat lipofilik, sifat elektronik dan sifat sterik. Ditinjau dari mekanisme kerja kedua senyawa (siprofloksasin dan ofloksasin) yaitu menghambat secara selektif DNA bakteri yang lebih berkaitan dengan ikatan obat-reseptor, maka sifat sterik memberikan peranan penting dalam besarnya aktivitas dibandingkan sifat elektronik, sehingga pada penelitian ini sifat sterik (pKa) senyawa tidak ditentukan (Gringauz, 1997).

Sifat lipofilik yang ditentukan adalah nilai R_m dari siprofloksasin dan ofloksasin. Nilai R_m siprofloksasin dan ofloksasin didapatkan dengan metode KLTFB yang merupakan salah satu cara menentukan koefisien partisi senyawa melalui prinsip partisi solut terhadap fase diam dan fase gerak sehingga dapat menunjukkan sifat lipofilisitas senyawa tersebut. Dengan digunakannya eluen metanol-air pada beberapa perbandingan (5:5, 6:4, 7:3, 8:2), dapat ditentukan nilai R_m senyawa dalam sistem oktanol-air melalui kurva hubungan antara % metanol (v/v) dalam eluen (sumbu x) dengan nilai R_m senyawa pada konsentrasi tersebut (sumbu y) dan nilai R_m senyawa dalam sistem oktanol-air dapat diperoleh pada konsentrasi metanol 0%.

Nilai R_m senyawa dalam sistem oktanol-air menggambarkan lipofilisitas senyawa tersebut pada fase lemak dan fase air. Sifat lipofilik merupakan sifat fisikokimia yang mempengaruhi perjalanan obat melewati membran biologis.

Semakin tinggi nilai R_m senyawa, maka semakin tinggi sifat lipofilitas senyawa tersebut.

Dari hasil penelitian, nilai R_m siprofloksasin lebih besar dari ofloksasin yaitu 0,568, sedangkan R_m ofloksasin adalah 0,042. Perbedaan sifat lipofilik ini disebabkan oleh perbedaan gugus-gugus yang terikat pada atom karbon posisi 7 dan atom nitrogen posisi 1 pada siprofloksasin dan ofloksasin. Adanya tambahan siklopropil pada nitrogen inti 4-kuinolon siprofloksasin menyebabkan lipofilisitas siprofloksasin menjadi lebih besar dibandingkan dengan ofloksasin. Hal ini karena gugus siklopropil tersebut lebih lipofil daripada gugus propil pada N inti 4-kuinolon ofloksasin yang membentuk cincin dengan atom O. Atom O tersebut lebih mudah berinteraksi dengan air melalui ikatan hidrogen sehingga membuat sifat ofloksasin menjadi lebih polar daripada siprofloksasin. Mengingat siprofloksasin lebih lipofilik dibandingkan dengan ofloksasin, maka siprofloksasin lebih mudah menembus membran atau dinding sel bakteri dan paling banyak mencapai reseptor sehingga akan memiliki aktivitas yang lebih besar.

Sifat sterik merupakan sifat yang berpengaruh pada interaksi obat dengan reseptor. Pada penelitian ini sifat sterik yang ditentukan adalah Refraksi Molar senyawa yang ditentukan melalui pengukuran indeks bias dan densitas larutan senyawa dalam metanol pada suhu 30°C . Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan nilai Refraksi Molar siprofloksasin dan ofloksasin yaitu siprofloksasin 215,75cc/mol dan ofloksasin 289,43cc/mol.

Perbedaan sifat sterik tersebut disebabkan adanya perbedaan substituen pada inti 4-kuinolon siprofloksasin dan ofloksasin. Cincin piperazin yang terdapat pada struktur molekul siprofloksasin dan ofloksasin akan meningkatkan aktivitas antibakteri terhadap gram negatif termasuk *Pseudomonas aeruginosa*. Namun cincin piperazin yang termetilasi pada ofloksasin akan mengurangi aktivitas tersebut. Hal ini karena gugus metil dapat menyebabkan adanya halangan ruang pada saat cincin piperazin berikatan dengan reseptor. Siklopropil pada posisi nitrogen siprofloksasin sangat berperan aktivitas antibakteri karena akan mengikat reseptor secara spesifik. Sedangkan pada ofloksasin, adanya atom O pada posisi C-8 yang diikat oleh CH_2 akan memberikan efek meruah yang lebih besar sehingga kurang mendukung ikatan obat dengan reseptor, hal ini berdampak

negatif terhadap besarnya aktivitas. Hal ini menunjukkan bahwa ofloksasin lebih meruah sehingga sterik yang dimilikinya pun semakin besar. Secara teori Refraksi Molar suatu senyawa dapat diprediksikan dari struktur molekulnya yang khas. Setiap atom atau kelompok atom pada molekul senyawa tersebut memberikan sumbangan nilai pada nilai Refraksi Molar senyawa secara keseluruhan.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode dilusi menggunakan dua belas tabung yang diisi media Mueller Hinton Broth, suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (transmitan 25%) dan masing-masing larutan uji antibakteri, sehingga didapatkan kadar yang berbeda tiap tabungnya. Hasil KHM diperoleh melalui pengamatan pertumbuhan bakteri secara visual dengan membandingkannya dengan kontrol positif (tabung no.12) dan kontrol negatif (tabung no.1 dan no.11). kontrol positif (positif adanya pertumbuhan bakteri) berwarna hijau, hal ini karena sesuai dengan karakteristik pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu koloni yang berwarna hijau berfluoresensi. Tabung dengan kadar kadar senyawa aktif terendah yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (tampak jernih seperti pada kontrol negatif atau tidak berwarna hijau seperti pada kontrol positif) dicatat sebagai KHM.

Dari percobaan tersebut diperoleh Kadar Hambat Minimal (KHM) untuk siprofloksasin adalah 1,00 µg/ml dan untuk ofloksasin adalah 10,00 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa siprofloksasin memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap *Pseudomonas aeruginosa* daripada ofloksasin (hasil tersebut sesuai dengan yang disebutkan dalam literatur). Aktivitas siprofloksasin yang lebih besar daripada ofloksasin disebabkan karena siprofloksasin lebih lipofilik dibandingkan dengan ofloksasin sehingga siprofloksasin lebih mudah menembus membran bakteri dan lebih banyak mencapai tempat kerjanya di inti sel. Selain itu diduga volume molar siprofloksasin yang sudah sesuai dalam berinteraksi dengan reseptor ikut berperan dalam menentukan besarnya aktivitas siprofloksasin.

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

1. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh :
Nilai Rm (sifat lipofilik) untuk siprofloksasin (0,568) lebih besar daripada ofloksasin (0,042). Harga Refraksi Molar (sifat sterik) untuk siprofloksasin (215,75 cc/mol) lebih kecil daripada ofloksasin (289,43 cc/mol).
2. Aktivitas antibakteri (KHM) dari siprofloksasin dan ofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* adalah 1,00 µg/ml dan 10,00 µg/ml.
3. Ada pengaruh sifat fisikokimia (Rm dan Refraksi Molar) dari siprofloksasin dan ofloksasin terhadap aktivitas antibakterinya pada *Pseudomonas aeruginosa* yaitu nilai Rm yang tinggi dan nilai Refraksi Molar yang rendah dari siprofloksasin dibandingkan dengan ofloksasin menyebabkan aktivitas siprofloksasin lebih tinggi daripada ofloksasin.

7.2 SARAN

Perlu dilakukan modifikasi struktur pada substituen rantai samping inti 4-kuinolon ofloksasin untuk meningkatkan aktivitas antibakterinya dengan mempertimbangkan sifat lipofilik dan sifat sterik senyawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriole, V.T., 1988. In Vitro Properties of The Quinolone, in Phillips, I., King, A., Shannon, K (editor), *The Quinolones*. London: Harcourt Brace Jovovich, pp.83-87.
- Bailey and Scott's. 1990. *Diagnostic Microbiology*. eight edition, Missouri: CV Mosby Company, pp. 172-177, 386-389.
- Budavari, S., 2001. *The Merck Index*, Thirty edition, Whitehous, NJ: Merck and Co., INC, pp. 2337, 6732, 6800.
- Doerge, R.F., 1982. *Buku Teks Wilson dan Gisvold Kimia Farmasi dan Medisinal Organik*, Diterjemahkan oleh Fatah, A.M., Semarang: IKIP Semarang Press, hal. 7.
- Edberg, S.C., Berger, S.A., 1986. *Antibiotika dan Infeksi*, Diterjemahkan oleh Sanusi, C., Jakarta: Buku Kedokteran, hal. 199-209.
- McEvoy, G.K., 2002. *AHFS Drug Information*. Bethesda: America Society of Health System Pharmacists. pp. 764, 797, 804.
- Foye, W.O., 1995. *Prinsip-prinsip Kimia Medisinal*, Diterjemahkan oleh Rasyid, R. Dkk, jilid I, edisi kedua, Yogyakarta: GMU Press, hal.64.
- Gan,V.H.S., dan Iswanto Y.H., 1995. Antimikroba lain, dalam Sulistia Gan (editor), *Farmakologi dan Terapi*, edisi 4, Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 682-635.
- Gennaro, A.R., 2000. *Remington The Science and Practice of Pharmacy*, Twenty edition, Pjiladelphia: Philadelphia College of Pharmacy and Science, pp. 1539-1540.
- Gringauz, A., 1997. *Introduction to Medicinal Chemistry How Drug Act and Why*. Canada: Willey-VCH, pp. 265-269.
- Herman, J.M., 1977. *Bakteri, Klamidia dan Mikoplasma pada penyakit Hubungan Seksual*. Cermin Dunia Kedokteran, No. 117,199729.

- Maron, H., and Lando, J.B., 1974. *Fundamental of Physical Chemistry*. USA: Macmillan Publishing Co, Inc, pp. 182-184.
- Parfitt, K., 2002. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, Thirtythird edition, London: Pharmaceutical Press, pp. 185, 232.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R., 1986, *Microbiology*, Fifth edition. New York: Mc Graw Hill Book co, pp. 209-291.
- Rekker, R.F., 1977. *The Hydrofobic Fragmental Constant and Its Application of Partition Coefficient of Organic Structure in The Octanol Water System*. Amsterdam: Eilsivier Scietific Publishing Company, pp. 100-103.
- Ritschel, W.A., 1986. *HandBook of Pharmacocinetics*, Third edition, Hamilton: Drug Intelligence Publication, pp. 71-76.
- Sardjoko. 1993. *Rancangan Obat*, Cetakan pertama, Yogyakarta: Gajah Mada University, hal. 110, 1165-166.
- Siswandono dan Soekardjo.B.,2000. *Kimia Medisinal I*, Jilid kedua Surabaya: Airlangga University Press.
- Wattimena, J.R., Sugiarto, N.C., Widiyanto, M.B., Suksandar, E.Y., Soemardji, A.A., Setiadi, A.R., 1991. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*, Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hal. 62, 17-19.

Lampiran 1

Perhitungan Rm Siprofloksasin
Penentuan Persamaan Regresi Untuk Memperoleh Nilai Rm Siprofloksasin
dalam Sistem Oktanol–Air

No.	x	y	xy	(x) ²	(y) ²
	%v/v metanol dalam eluen	Nilai Rm			
1	50	1,17	58,5	2500	1,3689
2	60	1,35	81,0	3600	1,8225
3	70	1,38	96,5	4900	1,9044
4	80	1,57	125,6	6400	2,4649
Σ	260	5,47	361,7	17400	7,5607
Rata ²	65	1,3675			

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

$$= \frac{(4 \cdot 361,7) - (260 \cdot 5,47)}{(4 \cdot 17400) - 67600}$$

$$= 0,0123$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

$$= 1,3675 - 0,0123 \cdot 65$$

$$= 0,568$$

Persamaan → $y = 0,0123 x + 0,568$, maka Rm siprofloksasin = 0,568

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2] \times [n \cdot \sum (y)^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$= \frac{(4 \times 361,7) - (260 \times 5,47)}{\sqrt{[4 \times 17400 - (260)^2] \times [4 \times 7,5607 - (5,47)^2]}}$$

$$= 0,9695$$

Lampiran 2

Perhitungan Rm Ofloksasin
Penentuan Persamaan Regresi Untuk Memperoleh Nilai Rm Siprofloksasin
dalam Sistem Oktanol-Air

No.	x	y	xy	(x) ²	(y) ²
	%v/v metanol dalam eluen	Nilai Rm			
1	50	0,73	36,5	2500	0,5329
2	60	0,89	53,4	3600	0,7921
3	70	0,94	65,8	4900	0,8836
4	80	1,17	93,6	6400	1,3689
Σ	260	3,73	249,3	17400	3,5775
Rata ²	65	0,9325			

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

$$= \frac{(4 \cdot 249,3) - (260 \cdot 3,73)}{(4 \cdot 17400) - 67600}$$

$$= 0,0137$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

$$= 0,9325 - 0,0137 \cdot 65$$

$$= 0,042$$

Persamaan $\rightarrow y = 0,0137 x + 0,042$, maka Rm ofloksasin = 0,042

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2] \times [n \cdot \sum (y)^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$= \frac{(4 \times 249,3) - (260 \times 3,73)}{\sqrt{[4 \times 17400 - (260)^2] \times [4 \times 3,5775 - (3,73)^2]}}$$

$$= 0,9723$$

Lampiran 3

Perhitungan Refraksi Molar Metanol

1. Penentuan Densitas Metanol Pada Suhu 30°C

No.	Volume piknometer* (ml)	Massa metanol (g)	Densitas metanol (g/cc)
1	24,2686	19,0453	0,78477
2	24,6786	19,3664	0,78474
3	24,8653	19,5036	0,78437
Densitas metanol Rata-rata			$0,78463 \pm 2,23 \times 10^{-4}$

* Ditara dengan air

2. Perhitungan Refraksi Molar Metanol (R_1)

BM metanol = 32,04

Indeks bias metanol = 1,3263

$$\text{Rumus : } R_1 = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{M}{d}$$

Replikasi 1

$$R_1 = \frac{1,3263^2 - 1}{1,3263^2 + 2} \times \frac{32,04}{0,78477}$$

$$= 8,24427$$

Untuk replikasi 2 dan replikasi 3 dilakukan perhitungan dengan cara yang sama seperti di atas.

Lampiran 4

Perhitungan Refraksi Molar Siprofloksasin

Contoh Perhitungan Refraksi Molar Siprofloksasin

BM siprofloksasin (M_2) = 331,34

RM metanol (R_1) = 8,24 cc/mol

Indeks bias larutan = 1,3264

Densitas larutan (d) = 0,78272

$$RM \text{ larutan } (R_{12}) = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{(N_1 \cdot M_1) + (N_2 \cdot M_2)}{d}$$

$$RM \text{ zat } (R_2) = \frac{R_{12} - (R_1 \cdot N_1)}{R_2}$$

Massa siprofloksasin 0,1035 g

Mol senyawa = 0,00031 mol

$$\begin{aligned} \text{Massa metanol} &= 0,78463 \times 70,0 \\ &= 54,92410 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Mol metanol} &= \frac{54,92410}{32,04} \\ &= 1,71424 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Fraksi mol metanol } (N_1) &= \frac{1,71424}{1,71424 + 0,00031} \\ &= 0,99982 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Fraksi mol zat } (N_2) &= \frac{0,00031}{1,71424 + 0,00031} \\ &= 0,00018 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R_{12} &= \frac{1,3264^2 - 1}{1,3264^2 + 2} \times \frac{(0,99982 \times 32,04) + (0,00018 \times 331,34)}{0,78272} \\ &= 8,28 \text{ cc/mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R_2 &= \frac{8,28 - (8,24 \times 0,99982)}{0,00018} \\ &= 210,34 \text{ cc/mol} \end{aligned}$$

Untuk replikasi 2 dan replikasi 3 dilakukan perhitungan dengan cara yang sama seperti di atas.

Lampiran 5

Perhitungan Refraksi Molar Ofloksasin

Contoh Perhitungan Refraksi Molar Siprofloksasin

BM siprofloksasin (M_2) = 361,38

RM metanol (R_1) = 8,24 cc/mol

Indeks bias larutan = 1,3271

Densitas larutan (d) = 0,78328

$$RM \text{ larutan } (R_{12}) = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{(N_1 \cdot M_1) + (N_2 \cdot M_2)}{d}$$

$$RM \text{ zat } (R_2) = \frac{R_{12} - (R_1 \cdot N_1)}{R_2}$$

Massa ofloksasin 0,1066 g

Mol senyawa = 0,00029 mol

Massa metanol = 0,78463 x 70,0

= 54,92410 g

$$\text{Mol metanol} = \frac{54,92410}{32,04}$$

= 1,71424 mol

$$\text{Fraksi mol metanol } (N_1) = \frac{1,71424}{1,71424 + 0,00031}$$

= 0,99983

$$\text{Fraksi mol zat } (N_2) = \frac{0,00029}{1,71424 + 0,00029}$$

= 0,00017

$$R_{12} = \frac{1,3271^2 - 1}{1,3271^2 + 2} \times \frac{(0,99983 \times 32,04) + (0,00017 \times 361,38)}{0,78328}$$

= 8,29 cc/mol

$$R_2 = \frac{8,29 - (8,24 \times 0,99983)}{0,00017}$$

= 284,87 cc/mol

Untuk replikasi 2 dan replikasi 3 dilakukan perhitungan dengan cara yang sama seperti di atas.

Lampiran 6

Tabel harga r

<i>df</i> ^a	$\alpha = .05$	$\alpha = .01$
1	.99692	.999877
2	.9500	.99000
3	.878	.9587
4	.811	.9172
5	.754	.875
6	.707	.834
7	.666	.798
8	.632	.765
9	.602	.735
10	.576	.708
11	.553	.684
12	.532	.661
13	.514	.641
14	.497	.623
15	.482	.606
16	.468	.590
17	.456	.575
18	.444	.561
19	.433	.549
20	.423	.537
25	.381	.487
30	.349	.449
35	.325	.418
40	.304	.393
45	.288	.372
50	.273	.354
60	.250	.325
70	.232	.302
80	.217	.283
90	.205	.267
100	.195	.254

Lampiran 7

Sertifikat Analisis Siprofloksasin

浙江黄岩新嘉药物化工有限公司

XINHUA PHARMA CHEMICAL CO., LTD. HUANGYAN ZHEJIANG
化验报告书
CERTIFICATE OF ANALYSIS

产品名称 PRODUCT: 盐酸环丙沙星 CIPROFLOXACIN HYDROCHLORIDE
 报告日期 CERTIFICATE DATE: 2006.2.23 批号 BATCH NO.: 20060227
 生产日期 MANUFACTURE DATE: 2006.2.21 数量 QUANTITY: 500kg
 失效日期 EXPIRY DATE: 2009.2.21
 检验依据 STANDARD: 《美国药典》28版/United States Pharmacopoeia 28

检验项目 Contents of testing	规格要求 Specification	检验结果 Results
外观 Appearance	白色或微黄色结晶性粉末 White or light-yellow crystalline powder	微黄色结晶性粉末 Light-yellow crystalline powder
鉴别 Identification	符合规定 Meet the requirements	符合规定 Meet the requirements
酸度 PH	3.0-4.5 Between 3.0 and 4.5	3.8
水分 Water	4.7%-6.7% Between 4.7% and 6.7%	5.5%
炽灼残渣 Residue on ignition	≤0.1% Not more than 0.1%	0.05%
重金属 Heavy metals	≤0.002% Not more than 0.002%	<0.002%
硫酸盐 Sulfate	≤0.04% Not more than 0.04%	<0.04%
氟喹诺酮酸 Fluoroquinolonic acid	应符合规定 Meets the requirements	符合规定 Meet the requirements
色谱纯度 Chromatographic purity	≤0.5% Not more than 0.5%	0.2%
环丙沙星乙二胺类似物 Ciprofloxacin ethylenediamine analog	≤0.2% Not more than 0.2%	<0.05%
其它任何单个杂质 Any other individual impurity	≤0.2% Not more than 0.2%	<0.2%
含量 (以无水物计) Assay (on the anhydrous basis)	98.0%-102.0% (C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃ ·HCl) Between 98.0% and 102%	99.2%

结论: 符合《美国药典》28版

Conclusion: Meet the requirements of United States Pharmacopoeia 28

质检科长 [王瑞琴]
THE CHIEF OF QUALITY CONTROL DEPARTMENT化验员 [王瑞琴]
ANALYST

PT. SETIA KAWAN ABADI

Lampiran 8

Sertifikat Analisis Ofloksasin



ZHEJIANG HENGDIAN ENTERPRISE GROUP CO.
HENGDIAN INDUSTRIAL SECTION, LONGYANG, ZHEJIANG CHINA P.O.: 322116

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product : OFLOXACIN Batch No. : KY-OF-M20060318
 Manufacturing Date : MAR. 2006 Date Of Report : MAR. 2006
 Expiry Date : MAR. 2009 Report No. : 202826
 Quantity : 500kgs

Reference standard : USP28

Testing Item	Specifications	Results
Description	White or similar white crystalline powder	Conform
Identification	Positive reaction	Conform
Specific Rotation	+1° to -1°	Conform
Loss on drying	≤0.2%	0.10%
Residue on ignition	≤0.1%	<0.1%
Heavy metals	≤10ppm	<10ppm
Arsenic	≤1ppm	<1ppm
Related substances	meets the requirements	
A. Individual impurity	≤0.3%	0.08%
B. 8-desfluoro ofloxacin	≤0.2%	<0.1%
C. total impurity	≤0.5%	0.15%
Residual		
A. methanol	≤50ppm	<50ppm
B. ethanol	≤500ppm	<500ppm
Assay (on the dried basis)	98.5% - 101.5%	98.39%

Conclusion Conform to USP28

Director: 王健平

Check: 张敏琴

Lab. Technician: 李银芝



Lampiran 9

Uji Biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

DEPARTEMEN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA
 Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya 60286
 Telp. Tata Usaha : 031-5021451, Kabag. TU / Fax.: 031-5021452 pos. 104, 031-5020388
 E-mail : bbksub@bbksub.net.id



Surabaya, 10 April 2007

Hasil Uji Biokimia terhadap bakteri :- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

No	Macam-macam uji	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
1.	Pengecatan gram	Gram neg batang
2.	Catalase	positif
3.	Oxidase	positif
4.	Figural	positif (airan)
5.	Glucose	negatif
6.	Laktose	negatif
7.	Maltose	negatif
8.	Indol	negatif
9.	Methyl Red	negatif
10.	Citrate Citrat	positif
11.	Motility	positif
12.	Lysine	positif
13.	Arginine	positif
14.	Ornithine	positif

BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN
 SURABAYA
 SURABAYA MIKROBIOLOGI



Dr. Eyo W. Irawan
 No. 206 418