

# SKRIPSI

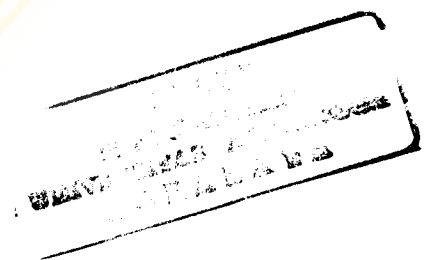
**FITRIA MUSLIMAH PUTRI**

**STUDI HUBUNGAN KADAR SENYAWA AKTIF  
N-(4-KLOROBENZOIL)SEFALEKSIN  
YANG DITETAPKAN SECARA KOLORIMETRI DENGAN  
AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



FF 115/08

Put  
s



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

## Lembar Pengesahan

**STUDI HUBUNGAN KADAR SENYAWA AKTIF  
N-(4-KLOROBENZOIL)SEFALEKSIN  
YANG DITETAPKAN SECARA KOLORIMETRI DENGAN  
AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

## SKRIPSI

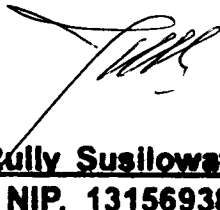
**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada  
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga  
2007**

Oleh :

**FITRIA MUSLIMAH PUTRI  
NIM : 050312675**

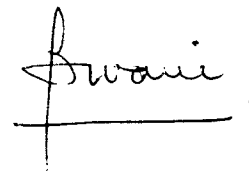
**Skripsi ini telah disetujui  
Pada tanggal 24 Agustus 2007 oleh :**

**Pembimbing Utama**

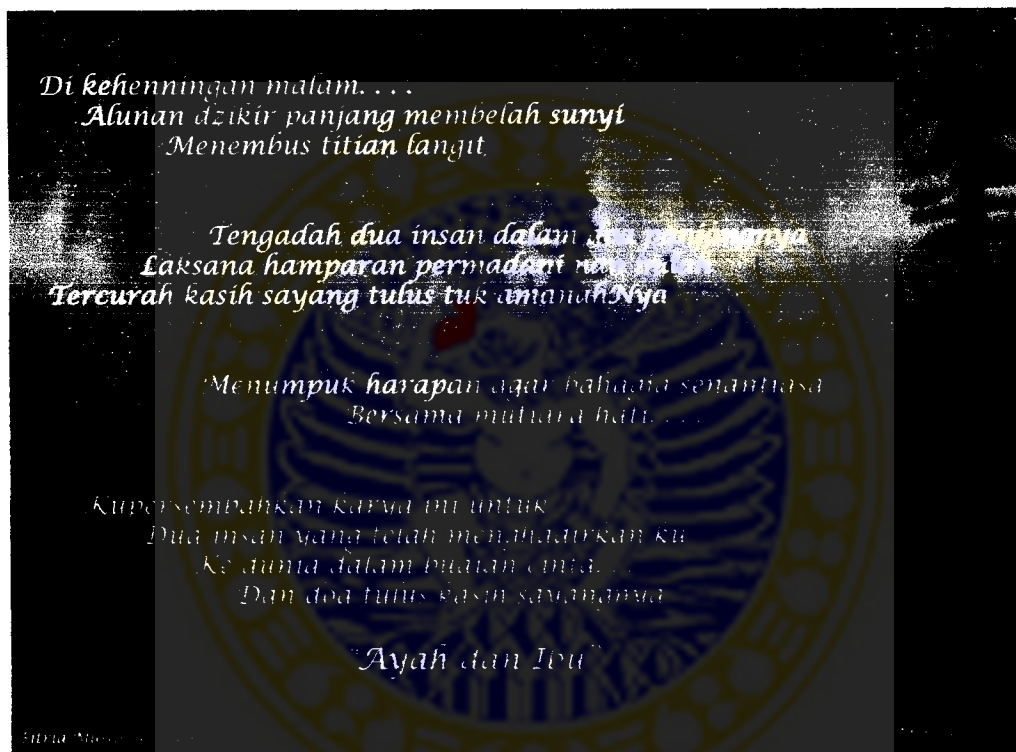


**Ir. Rully Susilowati, MS.  
NIP. 131569381**

**Pembimbing Serta**



**Drs. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt  
NIP. 131470995**



## KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr. wd,

Dengan mengucap rasa syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul

**“Studi Hubungan Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin Yang Ditetapkan Secara Kolorimetri Dengan Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”**

sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dalam proses penelitian dan pengerjaan skripsi ini sampai selesai, selain karena ridho Allah SWT, begitu banyak pihak yang ikut terlibat dalam pelaksanaan dan penulisan skripsi ini. Untuk itu, penghargaan dan terimakasih yang setulus hati penulis sampaikan kepada :

1. Ibu Ir. Hj. Rully Susilowati MS., selaku dosen pembimbing utama dan Bapak Drs. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt., selaku pembimbing serta yang dengan tulus ikhlas telah memberikan bantuan, bimbingan, saran, nasehat yang bermanfaat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. Achmad Syahrani, MS., yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
3. Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, MS., dan Drs. H. Harjana, M.Sc., sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik demi kesempurnaan hasil penelitian.
4. Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt., selaku Kepala Bagian Kimia Farmasi atas segala bimbingan serta fasilitas yang diberikan.
5. Dr. Aty Widyawaruyanti, M.Si., selaku dosen wali yang selalu memberikan arahan dan dorongan dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Staf pengajar di ex.Laboratorium Kimia Medisinal atas segala bantuan dan dukungannya.

7. Khusus kepada Papa dan Mama tercinta, terimakasih untuk curahan kasih sayang yang tak ternilai, dukungan, dorongan semangatnya serta do'a yang telah diberikan. Buat adik-adikku tersayang: Adi, Dewi, Adli teruslah belajar ya, jangan pernah patah semangat, jadilah orang yang bisa bikin papa dan mama bangga serta berguna bagi nusa dan bangsa. Aku menyayangi kalian.
8. Buat sahabat-sahabat ku Disha, Nisa, Ulliel terimakasih atas motivasi, saran, dukungan, pengalaman serta pelajaran yang sangat berharga.
9. Buat teman-teman seperjuangan ku, Nisa dan Paundra terimakasih atas semangat, bantuan, dukungan, saran dan berjuta-juta kebaikan kecil yang membuat ku tidak akan lupa.
10. Teman-teman skripsi di Kimia Medisinal Asti, Veny, Aris, Tyas, Esti, Susanti, Eka, Marwinary, Santi, Ratih, Lina, Rika, Vety, Filia, Silvy, Erik, dll.
11. Teman-teman MaBes KarWis 5 mbak Ciets, mbak Ruri Kediri, Ndie, Devy, Nildut, Sintul, Jengkol, mbak Erna, Savit, Nina, Vyka, Lidya, dan Ulliel, terimakasih telah mengisi hari-hariku dengan penuh canda tawa, semangat, dan keceriaan
12. Mas Tanto dan Pak Djoe yang telah memberi kemudahan dalam peminjaman alat, bahan serta kerja lembur di Lab. Kimia Medisinal.
13. Orang-orang yang telah menjadi sumber inspirasi dalam proses pembelajaran dan tempat bercermin untuk introspeksi diri namun belum disebutkan namanya, terimakasih yang tiada terhingga

Skripsi ini masih belum sempurna, sehingga penulis berharap masukan dan kritik dari semua pihak untuk perbaikan skripsi ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita kalangan ilmiah dan masyarakat luas.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb  
Surabaya, 24 Agustus 2007



**RINGKASAN****STUDI HUBUNGAN KADAR SENYAWA AKTIF  
N-(4-KLOROBENZOIL)SEFALEKSIN  
YANG DITETAPKAN SECARA KOLORIMETRI  
DENGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Fitria Muslimah Putri

Penyakit infeksi masih menduduki tempat teratas diantara sekian banyak penyakit yang menyerang Indonesia, dengan demikian penggunaan antibiotik untuk mengantisipasi penyakit infeksi banyak digunakan. Sebagian besar kasus infeksi dapat diatasi dengan menggunakan antibiotika yang telah dikenal lama, antara lain yang paling sering digunakan adalah golongan  $\beta$ -laktam, sefaleksin adalah salah satu antibiotik golongan  $\beta$ -laktam yang sering digunakan masyarakat.

Turunan baru sefaleksin, yaitu N-(4-klorobenzoil)sefaleksin mempunyai gugus 4-klorobenzoil yang dapat meningkatkan sifat elektronik sehingga meningkatkan penembusan senyawa kedalam membran biologis. Penambahan gugus 4-klorobenzoil ini dapat meningkatkan aktivitas antibakteri senyawa sefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Aktivitas turunan sefaleksin sebagai antibakteri hanya dapat terjadi bila cincin  $\beta$ -laktam masih dalam bentuk utuh.

Selama masa penyimpanan, distribusi, sampai saat digunakan oleh penderita, senyawa aktif sefaleksin dalam sediaan dapat mengalami peruraian oleh pengaruh cahaya, suhu, dan kelembaban. Hal ini akan menyebabkan kadar senyawa aktif yang terkandung tidak sesuai dengan kadar awal pada saat pembuatan sehingga pemberian dosis menjadi tidak tepat, sehubungan dengan adanya hal itu perlu dilakukan analisis secara kuantitatif terhadap kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin. Selain ditentukan kadar secara kimia juga perlu dilakukan uji mikrobiologi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Sehubungan dengan hal diatas, telah diteliti apakah ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitasnya terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Metode penetapan kadar yang digunakan pada penelitian ini adalah kolorimetri dengan pereaksi hidroksilamin dan  $\text{Fe}^{3+}$  karena metode ini dapat digunakan untuk penetapan kadar antibiotika turunan sefalosporin. Metode ini didasarkan pada reaksi antara N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan hidroksilamin yang berakibat terbukanya cincin  $\beta$ -laktam N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dan terbentuknya N-(4-klorobenzoil)sefaleksin hidroksamat, dengan adanya ion feri akan membentuk kompleks yang memberikan warna, kemudian serapannya dapat dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 449 nm.

Untuk mendapatkan kadar senyawa aktif yang bervariasi dilakukan pemanasan larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada berbagai suhu termasuk suhu kamar selama satu jam. Larutan uji ditetapkan kadarnya dengan kolorimetri dan ditentukan aktivitasnya dengan metode difusi secara simultan.

Penentuan diameter daerah hambatan larutan uji pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi silinder. Adapun media yang digunakan adalah media Antibiotik I.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa semakin tinggi suhu pemanasan maka semakin rendah kadar senyawa aktif, sehingga diameter daerah hambatan yang dihasilkan semakin kecil. Hal ini berarti bahwa dengan adanya pemanasan akan mempercepat terjadinya degradasi larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.

Hasil analisis regresi antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitasnya terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan harga  $r = 0,9950$  ( $n = 5$ ;  $\alpha = 0,05$ ;  $db = 3$ ;  $r$  tabel =  $0,878$ ). Jadi dapat dinyatakan bahwa ada korelasi linier antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang ditunjukkan dengan diameter daerah hambatan. Korelasi tersebut dapat dinyatakan dalam persamaan garis regresi sebagai  $y = 4,635 \times 10^{-3}x + 13,874$ .



**ABSTRACT****The Correlation Study Between the Level of Active Compound N-(4-Chlorobenzoyl)cephalexin determined by Colorimetric Method with Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923****Fitria Muslimah Putri**

This research was done to find the correlation between the level of active compound N-(4-chlorobenzoyl)cephalexin determined by colorimetric method with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 which expressed as inhibition zone diameter.

Determination of active compound was chemically done with colorimetric method. The active substance was obtained from heating solutions in various temperature, and determined by colorimetric method using hydroxylamine hydrochloride. The method is based upon the facts that active compound N-(4-chlorobenzoyl)cephalexin reacts rapidly with hydroxylamine hydrochloride to give a hidroxamic acid which forms a yellow complex with ferric ion that can be determined using ultraviolet-visible spectrophotometer.

The microbiological test of the active substance solution was done with was done with cylinder diffusion method using Antibiotic-I media. Activity was expressed as inhibition area diameter.

The data was analyzed by regresion test showing the existence of significant linear relation between the level of active compound N-(4-chlorobenzoyl)cephalexin determined by colorimetric method (variable x) and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 which expressed as inhibition zone diameter (variable y). This relations has expressed with the equations  $y = 4,635 \times 10^{-3}x + 13,874$  ( $r = 0,9950$  ;  $n=5$  ;  $\alpha=0,05$  ;  $db=3$ ).

This results showed that the level of active compound N-(4-chlorobenzoyl)cephalexin determined by colorimetric method (chemical test) can describe the level of active compound matched with antibacterial activity (microbiological test).

**Keyphrases:** N-(4-chlorobenzoyl cephalexin, colorimetric method, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*.



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>RINGKASAN</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Hipotesis Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1. Tinjauan Tentang Sefaleksin.....	6
2.1.1. Sifat Fisika Kimia Sefaleksin.....	7
2.1.2. Stabilitas Sefaleksin.....	7
2.2. Tinjauan Tentang Senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	8
2.3. Penetapan Kadar Senyawa Aktif Sefaleksin Secara Kimia.....	8
2.3.1. Metode Spektrofotometri Ultraviolet.....	8
2.3.2. Metode Iodometri.....	9
2.3.3. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	10
2.3.4. Metode Kromatografi Lapis Tipis.....	10
2.3.5. Metode Kolorimetri.....	10
2.4. Tinjauan Tentang <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.4.1. Morfologi.....	11
2.4.2. Biakan.....	11
2.4.3. Sifat-sifat Pertumbuhan.....	12

	Halaman
2.4.4 Resistensi.....	12
2.5. Uji Aktivitas Secara Mikrobiologi.....	12
2.5.1. Metode Dilusi.....	12
2.5.2. Metode Difusi.....	13
<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL.....</b>	<b>16</b>
3.1. Uraian Kerangka Konseptual.....	16
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
4.1. Bahan-bahan.....	19
4.2. Alat-alat.....	19
4.4. Pemeriksaan Kualitatif Terhadap N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	21
4.4.1. Pemeriksaan Organoleptis.....	21
4.4.2. Pemeriksaan Titik Lebur.....	21
4.4.3. Reaksi Warna.....	21
4.4.4. Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis.....	21
4.5. Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
4.5.1. Pewarnaan Gram.....	22
4.5.2. Tes Katalase.....	22
4.6. Penetapan Kadar Larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin secara Kolorimetri.....	22
4.6.1. Pembuatan Larutan Pereaksi.....	22
4.6.2. Pembuatan Larutan Baku Kerja N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	23
4.6.3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	24
4.6.4. Penentuan Waktu Optimum Pengamatan.....	24
4.6.5. Pembuatan Kurva Baku N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	24
4.6.6. Penyiapan Larutan Uji.....	25
4.6.7. Penentuan Kadar Larutan Uji.....	25
4.6.8. Replikasi.....	25
4.7. Penentuan Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	26
4.7.1. Pembuatan Media Antibiotik I.....	26

	Halaman
4.7.2. Pembuatan Inokulum Bakteri.....	26
4.7.3. Penentuan Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji.....	26
4.8. Analisis Data.....	28
4.8.1 Hubungan Antara Kadar Senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin Dengan Aktivitas Antibakteri Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	28
<b>BAB V. HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>29</b>
5.1. Pemeriksaan kualitatif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin .....	29
5.2. Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	30
5.3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	30
5.4. Penentuan Waktu Optimum Pengamatan.....	31
5.5. Penetapan Kadar Senyawa aktifN-(4-klorobenzoil)sefaleksin secara Kolorimetri.....	31
5.5.1. Pembuatan kurva baku I larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin .....	32
5.5.2. Penetapan Kadar Larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	32
5.5.3. Pembuatan Kurva Baku II Larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	33
5.5.4. Penetapan kadar larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin .....	34
5.6. Penentuan Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	36
5.7. Hubungan Antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin Pada Berbagai Suhu Dengan Aktivitas Antibakteri Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	36
<b>BAB VI. PEMBAHASAN .....</b>	<b>39</b>
<b>BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>43</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>46</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil pemeriksaan organoleptis N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	29
Tabel 5.2 Hasil pemeriksaan jarak lebur N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	29
Tabel 5.3 Hasil uji KLT N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	30
Tabel 5.4 Hasil identifikasi dan data pustaka <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	30
Tabel 5.5 Serapan kompleks feri- N-(4-klorobenzoil)sefaleksin hidroksamat pada berbagai panjang gelombang.....	31
Tabel 5.6 Nilai serapan dan kadar larutan baku I N-(4-klorobenzoil) sefaleksin.....	32
Tabel 5.7 Hasil penentuan kadar pada berbagai perlakuan suhu kamar, 50°C, 60°C.....	33
Tabel 5.8 Nilai serapan dan kadar larutan baku II N-(4-klorobenzoil) Sefaleksin.....	33
Tabel 5.9 Hasil penentuan kadar pada berbagai perlakuan suhu 70°C, 80°C.....	35
Tabel 5.10 Kadar rata-rata senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada berbagai suhu.....	35
Tabel 5.11 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-(4-klorobenzoil) sefaleksin pada berbagai kadar terhadap <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923.....	36
Tabel 5.12 Kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dan diameter daerah hambatan terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	38

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur Molekul Sefaleksin.....	6
Gambar 2.2. Struktur Molekul N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	8
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual.....	18
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian.....	20
Gambar 4.2 Skema Uji Aktivitas Antibakteri dari Larutan Uji.....	27
Gambar 5.1 Kurva Hubungan Kadar Terhadap Serapan dari Larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	32
Gambar 5.2 Kurva Hubungan Kadar Terhadap Serapan dari Larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	34
Gambar 5.3 Kurva Hubungan Antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-Klorobenzoil) sefaleksin Dengan Diameter Daerah Hambatan Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	38

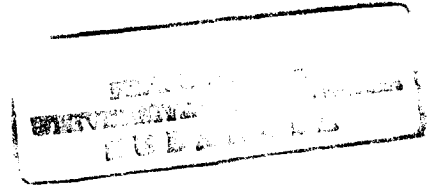


## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Sertifikat Analisis Senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.....	46
Lampiran 2 Spektra Serapan Panjang Gelombang Maksimum N-(4-Klorobenzoil) Sefaleksin.....	47
Lampiran 3 Perhitungan Uji Regresi dan Uji Distribusi F antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil) sefaleksin terhadap serapannya Kurva baku I.....	48
Lampiran 4 Perhitungan Uji Regresi dan Uji Distribusi F antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil) sefaleksin terhadap serapannya Kurva baku II.....	49
Lampiran 5 Perhitungan Uji regresi dan Uji Distribusi F antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan Aktivitasnya terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	50
Lampiran 6 Tabel r.....	51
Lampiran 7 Tabel F.....	52
Lampiran 8 Gambar Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-(4-klorobenzoil) sefaleksin Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	53
Lampiran 9 Surat Keterangan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	54

# BAB I

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi masih menduduki tempat teratas diantara sekian banyak penyakit yang menyerang Indonesia. Penyebab penyakit ini adalah mikroorganisme atau parasit yang masuk dalam tubuh dan menimbulkan berbagai gangguan fisiologis normal tubuh sehingga timbul penyakit infeksi. Dengan demikian penggunaan antibiotik untuk mengantisipasi penyakit infeksi banyak digunakan oleh negara sedang berkembang seperti Indonesia (Wattimena, 1991).

Penemuan penisilin oleh Alexander Fleming pada tahun 1928 adalah titik tolak penelitian antibiotik. Antibiotik tersebut mempunyai arti penting yang sangat bermakna dalam bidang kedokteran sejak digunakan untuk terapi oleh Florey dan Chain serta rekan-rekannya pada tahun 1940 di Universitas Oxford. Sampai saat ini telah banyak antibiotik yang berhasil ditemukan dan dikembangkan baik secara teknik sintesis maupun semisintesis. Berbagai jenis antibiotika tersebut dikarakterisasi berdasarkan struktur kimia, tempat kerja, dan spektrum aktivitasnya (Gan dan Isdiantoro, 1995).

Antibiotik merupakan senyawa kimia khas yang dihasilkan oleh mikroorganisme hidup yang mempunyai kemampuan untuk menghambat proses penting kehidupan suatu spesies atau mikroorganisme lain. Sebagian besar kasus infeksi dapat diatasi dengan menggunakan antibiotika yang telah dikenal lama, antara lain yang paling sering digunakan adalah golongan  $\beta$ -laktam sebab golongan ini relatif aman, kecuali pada penderita yang sensitif (Nogradi T, 1992).

Sefalosporin merupakan salah satu antibiotik  $\beta$ -laktam yang berasal dari jamur *Cephalosporium acremonium* yang telah berhasil diisolasi oleh Brotzu pada tahun 1948. Pada dasawarsa terakhir, puluhan turunan sefalosporin baru telah ditemukan yang strukturnya telah diubah secara kimia dengan maksud memperbaiki aktivitasnya.

Sefaleksin merupakan turunan sefalosporin generasi pertama dan termasuk dalam kelompok deasetoksisefalosporin. Sefaleksin terutama aktif terhadap bakteri Gram positif seperti, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Pneumococcus*

*sp.*, serta beberapa bakteri Gram negatif seperti *Escheria coli*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clebsiela pneumonia*, *Proteus mirabilis*, dan *Haemophilus influenzae* (Gan dan Isdiantoro, 1995).

Sefaleksin terutama digunakan untuk pengobatan infeksi saluran seni karena sedikit diikat oleh protein plasma dan sebagian besar dieksresi melalui ginjal dalam bentuk tidak berubah. Sefaleksin juga digunakan untuk pengobatan infeksi kardiovaskular, saluran nafas, kulit dan jaringan. Sefaleksin dapat diberikan secara oral karena mengandung gugus  $\alpha$ -amino yang menyebabkan senyawa ini tahan terhadap asam lambung. Obat diabsorpsi pada saluran cerna ( $\pm 90\%$ ), kadar plasma tertinggi dicapai setelah satu jam pemberian dengan waktu paruh serum 0,8-2 jam (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Untuk meningkatkan aktivitas antibakteri atau memperluas spektrum antibakterinya, telah dikembangkan beberapa senyawa turunan sefaleksin. Suko Hardjono dan kawan-kawan (2002) telah melakukan sintesis beberapa senyawa turunan sefaleksin, salah satu diantaranya adalah N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih tinggi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dibanding senyawa induknya yaitu sefaleksin, hal ini disebabkan penambahan gugus 4-klorobenzoil yang dapat meningkatkan sifat elektronik akan meningkatkan penembusan senyawa kedalam membran biologis (Hardjono.S., 2002).

Senyawa aktif mempunyai arti senyawa dalam bentuk utuh dilihat dari struktur kimianya dan dapat menimbulkan efek pada sistem biologis serta pada kadar yang tinggi memberikan aktivitas yang tinggi. Selama masa penyimpanan, distribusi, sampai saat digunakan oleh penderita, senyawa aktif sefaleksin dalam sediaan dapat mengalami peruraian oleh pengaruh cahaya, suhu, dan kelembaban. Hal ini akan menyebabkan kadar senyawa aktif yang terkandung tidak sesuai dengan kadar awal pada saat pembuatan sehingga pemberian dosis menjadi tidak tepat. Karena itulah perlu dilakukan analisis secara kuantitatif terhadap kadar senyawa aktif sefaleksin.

Untuk penetapan kadar senyawa aktif sefaleksin dapat dilakukan secara kimia maupun secara mikrobiologi. Umumnya penetapan kadar secara kimia lebih

cepat daripada metode mikrobiologi karena variabel yang mempengaruhi hasil lebih sedikit. Namun penetapan kadar secara mikrobiologi mempunyai keunggulan dalam hal kepekaan terhadap produk degradasi yang tidak aktif secara mikrobiologis, sehingga mampu mengeliminasi kesalahan hasil penetapan kadar secara kimia (Anonim, 1990). Secara mikrobiologis dapat pula ditunjukkan aktivitas (potensi) antibiotika yang sesuai dengan efek daya hambatnya terhadap mikroba. Sedikit penurunan daya antimikroba akan menunjukkan perubahan kecil yang tidak dapat ditunjukkan oleh metode kimia, sehingga pengujian secara mikrobiologis masih merupakan standar untuk mengatasi keraguan tentang kemungkinan hilangnya aktivitas (Anonim, 1995).

Metode penetapan kadar N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dikembangkan dari metode-metode yang digunakan untuk penetapan kadar penisilin yang didasarkan pada cincin  $\beta$ -laktam dalam molekul. Penetapan kadar secara kimia ini dapat dilakukan antara lain dengan Spektrofotometri UV-ST, Kolorimetri, titrasi Iodometri, Kromatografi Lapis Tipis, Spektrofourometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Yamana and Tsuji, 1976).

Dalam penelitian ini digunakan metode kolorimetri dengan menggunakan pereaksi hidroksilamin. Metode kolorimetri dipilih karena metode ini mudah dilakukan dan spesifik dalam menentukan kadar senyawa yang mengandung cincin  $\beta$ -laktam. Metode ini didasarkan pada reaksi antara hidroksilamin dengan gugus karbonil  $\beta$ -laktam cincin sefem yang membentuk sefaleksin hidroksinamat, kemudian kompleks sefaleksin hidroksinamat yang direaksikan dengan ion ferri akan menghasilkan warna dan serapannya dapat dibaca dengan spektrofotometer UV-ST (Yamana and Tsuji, 1976).

Untuk mengetahui apakah kadar yang diperoleh secara kolorimetri tersebut mencerminkan kadar senyawa aktif secara biologis, maka pada penelitian ini akan dilakukan studi hubungan antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*. Untuk memperoleh kadar senyawa aktif yang bervariasi akan dilakukan pemanasan larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada berbagai suhu.



Penetapan potensi antibiotika secara mikrobiologi dapat dikelompokkan dalam dua cara yaitu cara difusi dan cara dilusi. Cara difusi berdasarkan pada difusi antibiotika pencadang kedalam 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 tertinggi sampai terendah yang dibuat dengan cara pengenceran (Wattimena, 1991; Edberg, 1980).

Pada uji secara mikrobiologis dalam penelitian ini dipilih metode difusi karena mempunyai keuntungan yaitu rentang konsentrasi zat uji lebih besar, lebih praktis, teliti dan relatif lebih ekonomis serta memiliki reabilitas yang tinggi. Uji aktivitas yang diperoleh dengan metode difusi dinyatakan dengan diameter daerah hambatan (Black, 1999; Anonim, 1995).

Bakteri yang digunakan untuk pengujian potensi antibakteri adalah bakteri yang sensitif dan peka terhadap antibiotika yang diuji. Berdasarkan Farmakope Indonesia edisi IV bakteri yang digunakan untuk pengujian potensi antibakteri dari sefalekssin adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang merupakan bakteri Gram positif yang peka terhadap sefalekssin (Anonim, 1995).

## 1.2 Rumusan masalah

Dari uraian diatas permasalahan yang timbul adalah apakah ada hubungan linier antara hasil penetapan kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefalekssin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefalekssin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

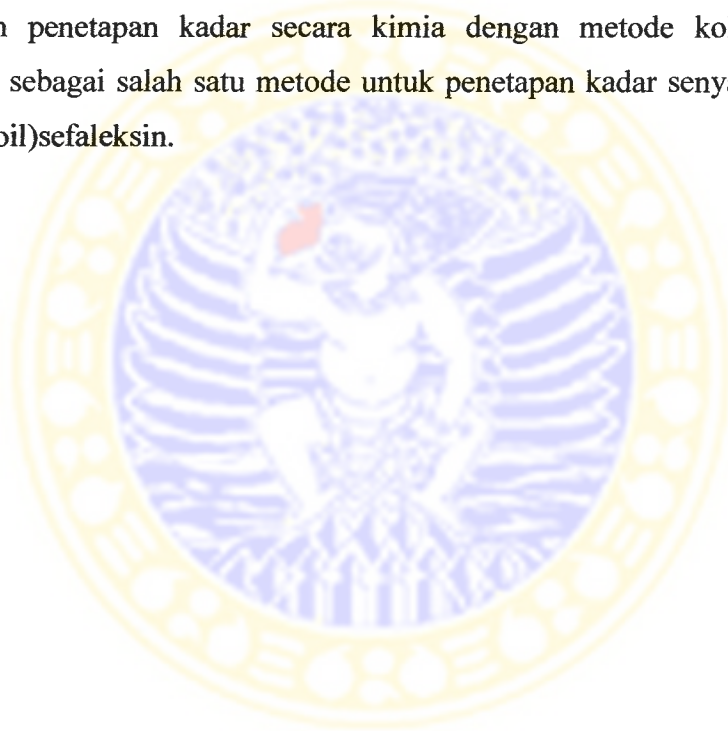


#### 1.4 Hipotesis Penelitian

Ada hubungan linier antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapat dari penelitian ini adalah setelah diperoleh hubungan yang linier antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kimia dengan aktivitas antibakteri secara mikrobiologis diharapkan penetapan kadar secara kimia dengan metode kolorimetri dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk penetapan kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.



## BAB II

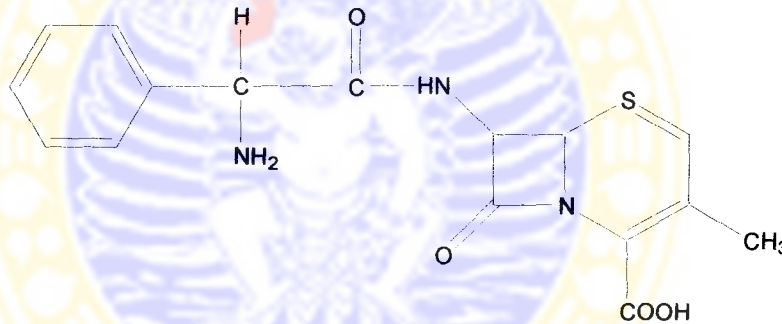
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Tentang sefaleksin

Sefaleksin merupakan salah satu turunan sefalosporin generasi pertama yang dapat diberikan secara per oral karena mengandung gugus  $\alpha$ -amino yang menyebabkan senyawa tersebut tahan terhadap asam lambung (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Sefaleksin mempunyai dua isomer, dimana D isomer lebih tinggi aktivitas biologisnya daripada L isomer (Florey, 1975).

Nama kimia sefaleksin adalah 7- $\alpha$ -(D-amino- $\alpha$ -phenylacetamida)-3-methylcephem-carboxylic acid (Martin, 1982). Dengan rumus kimia  $C_{16}H_{17}N_3O_4S$  dan massa molekul relatif 347,40 (Anonim, 1995).

Rumus Molekul:



Gambar 2.1 Struktur Molekul Sefaleksin

Aktivitas antibakteri antibiotika golongan sefalosporin secara langsung berhubungan dengan adanya cincin  $\beta$ -laktam yang tergabung dengan gugus dihidrotiazin, sehingga bila cincin  $\beta$ -laktam terbuka maka aktivitas antibakterinya menurun bahkan dapat menyebabkan hilangnya aktivitas antibakteri tersebut. Sefaleksin efektif terhadap bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Pneumococcus sp*, juga bakteri Gram negatif seperti *Escheria coli*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clebsiela pneumonia*, *Proteus mirabilis*, dan *Haemophilus influenzae* (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Mekanisme antibakteri turunan sefalosporin adalah dengan cara menghambat reaksi transpeptidase tahap ketiga atau tahap akhir dalam reaksi pembentukan dinding sel bakteri (Gan dan Isdiantoro, 1995).

Pada tingkat molekul, mekanisme kerja antibiotik  $\beta$ -laktam ditunjukkan oleh adanya serangan nukleofil dari enzim transpeptidase pada karbonil karbon cincin  $\beta$ -laktam yang bermuatan positif, menyebabkan terjadinya hambatan biosintesis peptidoglikan. Hal ini mengakibatkan dinding sel menjadi lemah dan mudah pecah atau lisis karena tekanan turgor dari dalam sehingga bakteri mengalami kematian (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Sefaleksin digunakan untuk pengobatan infeksi saluran seni karena sedikit diikat oleh protein plasma dan sebagian besar dieksresikan melalui ginjal dalam bentuk tidak berubah. Sefaleksin dapat digunakan untuk pengobatan infeksi pada sistem kardiovaskular, saluran nafas, kulit dan jaringan lunak (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

### **2.1.1 Sifat Fisika Kimia Sefaleksin**

Sefaleksin merupakan serbuk hablur berwarna putih sampai putih kuning gading, dengan bau yang khas dan mempunyai berat molekul 347,40. Data kelarutan menunjukkan sefaleksin larut dalam 100 bagian air, praktis tidak larut dalam etanol (95%) p, dan kloroform p. Sefaleksin dikenal dalam bentuk anhidrat, monohidrat, dihidrat, dan dalam bentuk garam natrium sefaleksin maupun sefaleksin lisinat (Florey, 1975; Reynolds, 1989).

### **2.1.2 Stabilitas Sefaleksin**

Stabilitas sefaleksin dalam bentuk larutan tergantung pada pH, degradasi terjadi dalam media basa dan akan tetap stabil dalam kondisi asam lemah. Stabilitas optimum sefaleksin tercapai pada pH 4,5. Beberapa mikroorganisme penghasil  $\beta$ -laktamase (sefalosporinase) dapat mempercepat degradasi sefaleksin. Degradasi sefaleksin juga terjadi karena panas, basa kuat, asam kuat, dan sinar ultraviolet (260 nm). Suhu penyimpanan tidak lebih dari 30°C, karena pada suhu diatas 30°C sefaleksin akan mengalami degradasi.

terbuka, baik secara kimia maupun enzimatik. Spektrum ultraviolet yang dihasilkan harus dimonitor secara periodik (Yamana and Tsuji, 1976).

### 2.3.2 Metode Iodometri

Metode iodometri dapat digunakan untuk penetapan kadar sefalosporin dalam bentuk utuh. Prinsip metode ini adalah reaksi yang terjadi antara iodium dengan sefalosporin yang terdegradasi. Iodium ditambahkan dalam jumlah berlebih dan kelebihan iodium dititrasi dengan Natrium tiosulfat yang digunakan sebelum dan sesudah degradasi ekuivalen dengan kelebihan iodium. Kelebihan iodium ini setara dengan kadar senyawa aktif sefalosporin (Yamana and Tsuji, 1976).

Faktor yang mempengaruhi absorbansi iodium adalah temperatur, waktu, pH dan konsentrasi larutan iodine. Metode iodometri mudah dilakukan karena tidak memerlukan peralatan khusus dan dapat digunakan untuk menentukan potensi sefalosporin dalam sediaan farmasi. Metode ini memiliki kelemahan sebagai sumber kesalahan utama yang mungkin terjadi selama penetapan kadar.

Kelemahan yang dimiliki metode ini adalah:

- Penguapan Iodium  
Penguapan iodium dalam larutan akan meningkat dengan meningkatnya temperatur. Hal ini mengakibatkan hasil titrasi senyawa aktif tidak sesuai dengan yang sebenarnya. Jika hasil titrasi dilakukan pada suhu kamar, hilangnya iodium akibat penguapan dapat dihindari dengan kalium iodium 4% dan disimpan dalam wadah tertutup rapat yang mampu mengurangi pengaruh cahaya.
- Oksidasi O<sub>2</sub>  
Oksidasi iodium oleh O<sub>2</sub> dari udara pada suasana netral tanpa adanya katalisator dapat diabaikan. Tetapi kecepatan oksidasi akan meningkat cepat dengan menurunnya pH. Reaksi ini juga akan meningkat jika dikatalisis oleh ion logam misalnya tembaga (Cu), ion nitrit dan juga pengaruh cahaya (Yamana and Tsuji, 1976).

### 2.3.3 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Metode ini digunakan untuk mengetahui kinetika degradasi dari beberapa sefalosporin. Detektor yang digunakan adalah detektor UV dengan panjang gelombang 254 nm dan kolom stainless steel dengan diameter 2 mm. Untuk sefaleksin fase diam yang digunakan adalah resin penukar ion, dan sebagai fase geraknya digunakan larutan natrium difosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,02 M yang diatur hingga pH 8,5 dengan menggunakan natrium hidroksida (Yamana and Tsuji, 1976).

### 2.3.4 Metode Kromatografi Lapis Tipis

Sebagai adsorben (fase diam) digunakan silika gel, selulosa, kertas kromatogram, sebagai fase gerak digunakan campuran pelarut dengan perbandingan-perbandingan tertentu dan penampak nodanya dapat dipakai sinar UV, ninhidrin iodoplatina, alkali permanganat dan asam phosphomolibdat (Florey, 1975).

### 2.3.5 Metode Kolorimetri

Metode ini digunakan untuk penetapan kadar senyawa yang mempunyai cincin  $\beta$ -laktam seperti sefalosporin dan penisilin. Metode ini spesifik untuk kelompok deasetoksisefalosporin, dimana sefaleksin termasuk di dalamnya (Yamana and Tsuji, 1976).

Metode ini didasarkan pada reaksi antara cincin  $\beta$ -laktam pada molekul sefaleksin dengan hidrosilamin dan membentuk sefaleksin hidrosinamat, dengan penambahan ion ferri pada larutan asam hidrosinamat, maka akan terjadi pembentukan kompleks berwarna. Serapan warna diamati dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm setelah 3 menit (Marelli, 1975).

Produk degradasi yang mengalami pemecahan pada cincin  $\beta$ -laktam saat perlakuan suhu tidak akan bereaksi dengan hidrosilamin, sehingga tidak akan mengganggu dalam penetapan kadar senyawa. Hidrosilamin hanya bereaksi dengan senyawa yang memiliki cincin  $\beta$ -laktam utuh. Untuk mengoreksi adanya



serapan bahan lain yang terdapat dalam larutan uji, digunakan blanko (Kolthoff and Sandell, 1952).

## 2.4 Tinjauan Tentang *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* termasuk bakteri Gram positif yang biasanya banyak terdapat pada hidung dan kulit manusia dengan proporsi yang berbeda-beda sesuai dengan kondisi kesehatannya. Bakteri ini dapat menimbulkan infeksi yang umumnya terjadi pada jaringan, antara lain : infeksi superficial, abses subkutan dan submukosa, osteopolinefritis, limfangitis, *staphylococcus food poisoning* yang menyebabkan muntah dan diare (Mackie and Cole, 1986).

### 2.4.1 Morfologi

*Staphylococcus aureus* dengan sel berbentuk bola dengan garis tengah 1  $\mu\text{m}$  yang tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak beraturan seperti anggur. Pada biakan cair tampak juga kokus tunggal, berpasangan, berbentuk tetrad dan berbentuk rantai. *Staphylococcus aureus* sifatnya non motil, katalase positif, tidak membentuk spora, dan koloni berwarna kuning keemasan (Jawetz *et al* 1996).

### 2.4.2 Biakan

Bakteri ini mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan bakteriologi aerobik atau mikroaerobik. Pertumbuhan paling optimal pada temperatur 37°C, tetapi pigmen terbentuk paling baik pada temperatur kamar (20-25°C). Setelah pembiakan selama 24 jam 37°C pada nutrient agar, agar susu atau agar darah, terbentuk koloni sirkular dengan diameter 1-3 mm dengan permukaan yang halus, berkilau, relatif buram, pigmen kuning keemasan, pH optimum 7,5. Pigmen tidak dihasilkan pada pembiakan aerobik atau pada kaldu.

Media selektif yang digunakan untuk pembiakan bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu agar garam manitol yang mengandung NaCl 7% atau kaldu yang mengandung NaCl 10% (Jawetz *et al*, 1996; Gillespie, 1994).

### 2.4.3 Sifat-sifat Pertumbuhan

*Staphylococcus aureus* dapat meragi karbohidrat menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik bervariasi tetapi enzim katalase dihasilkan secara tetap. Bakteri ini relatif tahan terhadap pengeringan, panas (50°C selama 30 menit) dan NaCl 9% serta mudah dihambat oleh zat-zat kimia tertentu seperti heksaklorofen 3% (Jawetz *et al*, 1996).

### 2.4.4 Resistensi

Resistensi pada *Staphylococcus aureus* dapat terjadi karena adanya produksi enzim  $\beta$ -laktamase yang disintesis dalam dinding sel dan dilepaskan secara ekstraseluler. Enzim  $\beta$ -laktamase mengkatalisis pembukaan cincin  $\beta$ -laktam sehingga sefalosporin menjadi tidak aktif lagi. Pada bakteri Gram negatif, enzim  $\beta$ -laktamase akan dieksresi pada ruang periplasmik. Ruang periplasmik adalah ruang antara peptidoglikan yang mengelilingi membran sitoplasma dengan membran luar yang sangat hidrofobik. Letak  $\beta$ -laktamase ini akan melindungi bakteri Gram negatif (Gillman *et al*, 1991).

## 2.5 Uji Aktivitas Secara Mikrobiologi

Aktivitas (potensi) antibiotik dapat ditunjukkan pada kondisi yang sesuai efek daya hambatnya terhadap mikroba. Penurunan aktivitas antimikroba juga 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. Penentuan kadar secara mikrobiologi mempunyai keuntungan dalam hal lebih peka dan mampu meniadakan hasil pada bentuk senyawa hasil peruraian (Anonim, 1995). Metode yang lazim digunakan untuk penentuan aktivitas antibakteri ada dua macam yaitu metode dilusi dan metode difusi (Jawetz *et al*, 1996).

### 2.5.1 Metode Dilusi

Prinsip metode dilusi adalah seri larutan antibiotik di dalam cairan media pertumbuhan bakteri yang dimulai dari konsentrasi tinggi sampai konsentrasi yang rendah. Kuman ditanam dalam media dalam jumlah tertentu dan setelah

diinkubasi akan nampak hambatan pertumbuhan. Metode ini dapat menentukan konsentrasi hambatan minimum dan konsentrasi bakterisida minimum. Metode dilusi dianggap sangat cocok dan akurat untuk menentukan kadar hambatan minimum dari antibiotik. Namun kerugian metode ini adalah mahal dan memerlukan waktu yang lama sehingga jarang digunakan untuk tes kepekaan di laboratorium rumah sakit (Lim, 1998).

Berdasarkan media, metode dilusi dapat dibedakan menjadi :

- **Metode Dilusi Cair**  
Suatu seri tabung berisi media cair, masing-masing mengandung antibiotik dengan konsentrasi yang berbeda. Isolat kuman ditanamkan kedalam setiap tabung dan dikontrol dengan cermat. Setelah tabung diinkubasi, hambatan pertumbuhan ditentukan dengan melihat kekeruhan masing-masing tabung. Konsentrasi hambat minimal secara makroskopis adalah konsentrasi dengan pengenceran tertinggi yang tetap jernih (Lim, 1998; Black, 1999).
- **Metode Dilusi Padat**  
Suatu seri lempeng berisi agar yang masing-masing berisi antibiotik dengan konsentrasi tertentu setelah penanaman kuman dan inkubasi, diperoleh konsentrasi penghambatan minimum dengan mengamati daerah yang tidak ditumbuhi bakteri (Lim, 1998).

### **2.5.2 Metode Difusi**

Metode difusi dilakukan dengan menuang media agar cair dan inokulum bakteri uji kedalam cawan petri kemudian dibiarkan memadat. Selanjutnya diatas media tersebut diletakkan pencadang yang diisi dengan larutan yang akan diuji aktivitasnya.

Metode ini didasarkan pada difusi larutan uji dari pencadang kedalam media yang telah ditanami bakteri uji. Setelah masa inkubasi pada suhu kamar akan nampak daerah jernih sekitar pencadang beserta daerah keruh yang mengelilinginya. Daerah jernih merupakan daerah yang tidak ditumbuhi bakteri, menunjukkan terjadinya hambatan pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai

daerah hambatan. Daerah hambatan ini sebanding dengan konsentrasi antibiotik dalam pencadang (Jawetz *et al*, 1996).

Berdasarkan pencadang yang digunakan, metode difusi dapat dibedakan menjadi :

- **Metode Difusi Cakram**

Metode ini menggunakan kertas sebagai pencadang. Kertas dijenuhkan dengan antibiotik dan diletakkan pada permukaan media uji. Kekurangan metode ini adalah adanya variabilitas produk kertas sehingga kandungan antibiotik tidak dapat diprediksi dengan tepat (Bonang dan Enggar, 1982).

- **Metode Difusi Silinder**

Metode ini menggunakan silinder logam atau gelas sebagai pencadang yang diisi dengan larutan antibiotik kadar tertentu dan ditanam pada media uji. Dengan metode silinder logam atau gelas, jumlah larutan antibiotik dapat diatur untuk menjamin tersedianya antibiotik dalam pencadang selama waktu inkubasi. Metode ini merupakan metode yang banyak digunakan untuk menentukan kepekaan bakteri terhadap berbagai macam antibiotik (Rawlins, 1998).

- **Metode Difusi Cetak Lubang**

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

Metode ini juga tercantum dalam Farmakope Indonesia IV untuk uji aktivitas secara mikrobiologi. Keuntungan metode difusi silinder logam adalah penggunaan yang relatif lebih ekonomis, cukup teliti, memiliki reabilitas yang tinggi, sederhana, fleksibel dan rentang konsentrasi antibiotika lebih luas dibanding metode difusi (Edberg, 1980).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi ukuran diameter hambatan :

- **Pemilihan Bakteri Uji**

Bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas adalah bakteri yang sensitif terhadap antibiotik tersebut. Bakteri yang digunakan adalah bakteri yang sedang dalam masa pertumbuhan.

- **Pembuatan Media Uji**

Media yang kaya nutrisi menghasilkan pertumbuhan bakteri yang lebih cepat sehingga menghasilkan diameter hambatan yang lebih kecil.



- **Ketebalan Media**  
Semakin tebal media maka diameter hambatnya semakin kecil.
- **Aktivitas Larutan Uji**  
Aktivitas larutan uji sebanding dengan konsentrasi dalam larutan uji.
- **Temperatur inkubasi**  
Semakin cepat pertumbuhan bakteri menghasilkan diameter hambat yang semakin kecil, karena itu temperatur harus dijaga sesuai dengan prosedur.
- **Media Inkubasi**  
Untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan bakteri diperlukan media yang memenuhi persyaratan-persyaratan tertentu antara lain media harus mengandung unsur-unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri, mempunyai tekanan osmose, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan bakteri, harus dalam keadaan steril dan tidak ditumbuhi oleh mikroba lain yang tidak diharapkan (Bonang dan Enggar, 1982).



## BAB III

### KERANGKA KONSEPTUAL

#### 3.1 Uraian Kerangka Konseptual

Sefaleksin merupakan antibiotik turunan safalosporin generasi pertama yang tahan terhadap  $\beta$ -laktamase luar sel yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* dan memiliki gugus  $\alpha$ -amino yang dapat menyebabkan senyawa tersebut stabil terhadap asam lambung. Sefaleksin efektif terhadap bakteri Gram positif dan beberapa Gram negatif. Senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan senyawa induknya yaitu N-benzoil sefaleksin.

Senyawa aktif mempunyai arti senyawa dalam bentuk utuh dilihat dari struktur kimianya dan dapat menimbulkan efek pada sistem biologis serta pada kadar yang tinggi memberikan aktivitas yang tinggi. Selama masa penyimpanan, distribusi, sampai saat digunakan oleh penderita, senyawa aktif sefaleksin dalam sediaan dapat mengalami peruraian oleh pengaruh suhu, kelembaban. Hal ini akan menyebabkan kadar senyawa aktif yang terkandung tidak sesuai dengan kadar awal pada saat pembuatan sehingga pemberian dosis menjadi tidak tepat. Karena itulah perlu dilakukan analisis secara kuantitatif terhadap kadar senyawa aktif sefaleksin.

Untuk penetapan kadar senyawa aktif sefaleksin dapat dilakukan secara kimia maupun secara mikrobiologi. Umumnya penetapan kadar secara kimia lebih cepat daripada metode mikrobiologi karena variabel yang mempengaruhi hasil lebih sedikit. Namun penetapan kadar secara mikrobiologi mempunyai keunggulan dalam hal kepekaan terhadap produk degradasi yang tidak aktif secara mikrobiologis, sehingga mampu mengeliminasi kesalahan hasil penetapan kadar secara kimia (Anonim, 1990).

Dalam penelitian ini akan digunakan metode kolorimetri dengan menggunakan pereaksi hidroksilamin. Metode kolorimetri dipilih karena metode ini mudah dilakukan dan spesifik dalam menentukan kadar senyawa yang mengandung cincin  $\beta$ -laktam. Metode ini didasarkan pada reaksi antara hidroksilamin dengan gugus karbonil  $\beta$ -laktam cincin sefam yang membentuk

sefaleksin hidroksinamat, kemudian kompleks sefaleksin hidroksinamat yang direaksikan dengan ion ferri akan menghasilkan warna dan serapannya dapat dibaca dengan spektrofotometer UV-ST (Yamana and Tsuji, 1976).

Untuk mengetahui apakah kadar yang diperoleh secara kolorimetri tersebut mencerminkan kadar senyawa aktif secara biologis, maka pada penelitian ini akan dilakukan studi hubungan antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, untuk memperoleh kadar senyawa aktif yang bervariasi akan dilakukan pemanasan larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada berbagai suhu (Widianti, 2005).

Penggambaran kadar senyawa aktif secara kimia dapat mencerminkan kadar senyawa aktif secara mikrobiologi sehingga akan terlihat hubungan linier yang bermakna.

Hubungan yang linier antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan diameter daerah hambatan pertumbuhan kuman dapat diperoleh dengan mengamati hasil percobaan, bahwa semakin tinggi kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin maka semakin besar diameter daerah hambatan.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

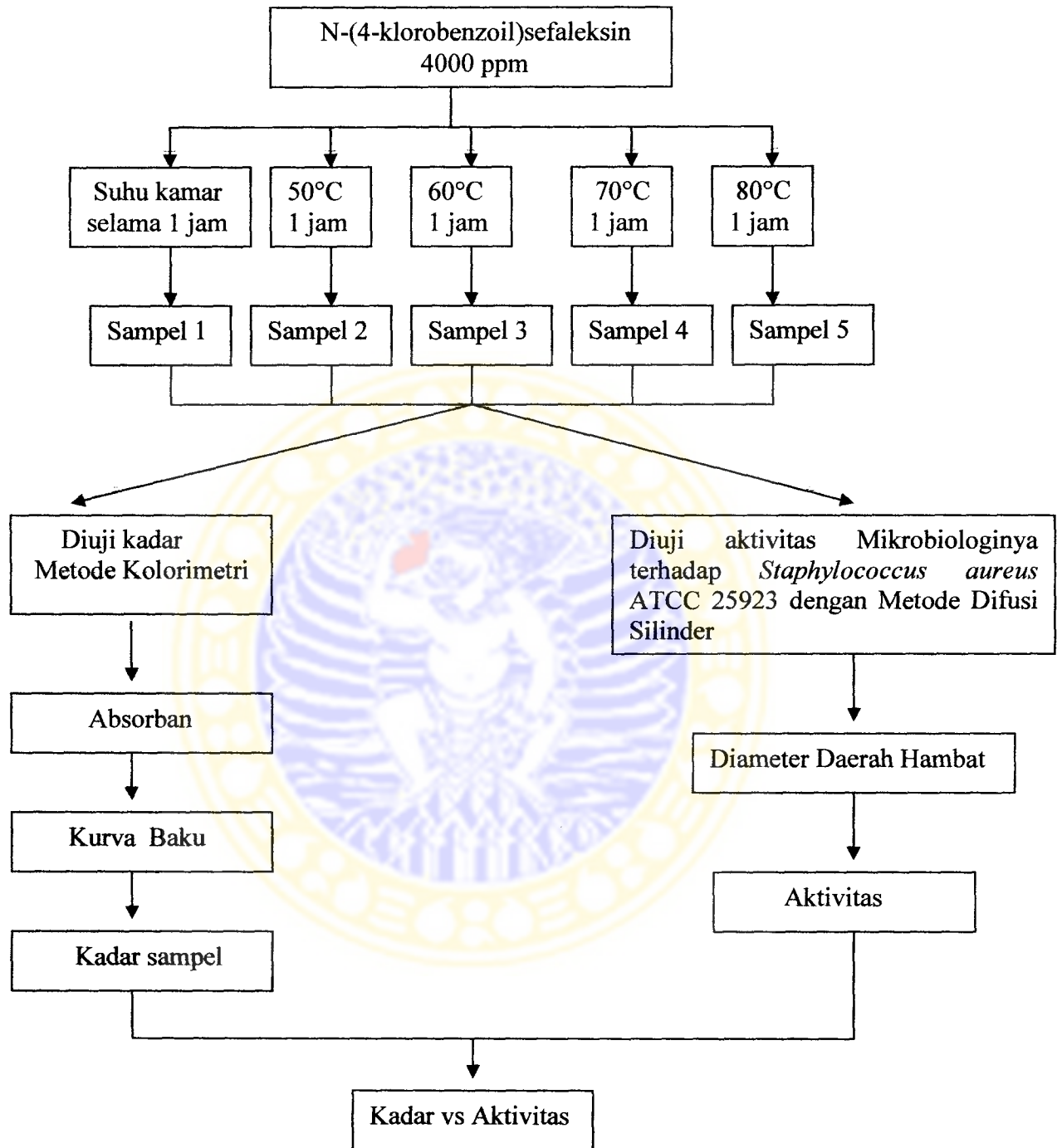
#### 4.1 Bahan

- N-(4-klorobenzoil)sefaleksin (Laboratorium Kimia Medisinal)
- Hidroksilamin HCl p.a. (Merck)
- Natrium hidroksida p.a. (Riedel-de-Haën)
- Asam klorida p.a. (Riedel-de-Haën)
- Ferri ammonium sulfat p.a. (Merck)
- Asam sulfat p.a. (Riedel-de-Haën)
- Metanol p.a (Merck)
- Bakteri *Staphylococcus aureus*
- Media Antibiotik 1 (Oxoid)
- NaCl isotonis steril (Otsuka)
- Air suling

#### 4.2 Alat

- *Electrothermal melting point apparatus*
- Neraca analitik Sartorius 2472
- UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-260 (Shimadzu)
- Autoklaf (All American)
- Laminar air flow (Kottermann model no.8580)
- Inkubator (Mettler model no.8540)
- Perangkat uji aktivitas mikrobiologis
- Termostat Julabo Sirculator type EM-12B
- pH meter (Fisher accument tipe 230A)
- Stopwatch dan Timer
- Alat gelas

### 4.3 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

#### 4.4 Analisa Kualitatif Terhadap N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

##### 4.4.1 Pemeriksaan Organoleptis

Meliputi pemeriksaan:

- Pemeriksaan bentuk
- pemeriksaan warna
- Pemeriksaan bau

##### 4.4.2 Pemeriksaan Titik Lebur

Dimasukkan sekitar 1 mg serbuk sefaleksin ke dalam pipa kapiler gelas dengan diameter kurang lebih 1 mm dan tinggi kurang lebih 8 cm, kemudian ujung yang lain ditutup. Sampel diusahakan mencapai ujung pipa kapiler yang tertutup dengan cara diketuk-ketuk. Pipa kapiler dipasang pada tempatnya pada alat *electrothermal melting point apparatus*. Kemudian diamati temperatur pada saat mulai melebur.

Dari hasil penelitian Hardjono, 2002, diketahui bahwa jarak lebur sefaleksin adalah 183-185°C sedangkan jarak lebur N-(4-klorobenzoil)sefaleksin adalah 187-189°C.

##### 4.4.3 Reaksi Warna

1. Larutkan 5 mg bahan dalam 3 ml air, ditambah 0,10 ml natrium hidroksida (80 g/l) dan biarkan selama 5 menit. Kemudian tambahkan 1,3 ml asam klorida (70 g/l) dan 10 tetes ferri klorida, akan dihasilkan warna merah ungu.
2. Larutkan 5 mg bahan dalam 1 ml air dan tambahkan 1-2 tetes ferri klorida (925 g/l) akan dihasilkan larutan tak berwarna.

##### 4.4.4 Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis

Pelarut	: Aseton
Fase diam	: Silica gel 60 GF254
Fase gerak	: Aseton : metanol : kloroform = 1 : 1 : 3
Penampak noda	: Lampu UV-254 nm



## 4.5 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

### 4.5.1 Pewarnaan Gram

Suspensi kuman dalam air suling steril pada gelas objek dikeringkan di udara terbuka dan difiksir dengan cara melewatkan gelas objek diatas api lampu spiritus beberapa kali. Kristal violet diteteskan pada gelas objek dan dibiarkan selama 20 detik. Sisa kristal violet dituang dan dicuci dengan air suling. Tetesi dengan larutan lugol, dibiarkan selama 1 menit kemudian warna yang terbentuk dihilangkan dengan alkohol 95% selama 10-20 detik. Lalu safranin dituangkan selama 10-30 detik, sisa safranin dibuang kemudian dibilas dengan air. Bakteri Gram positif berwarna ungu.

### 4.5.2 Tes Katalase

Pada biakan *Staphylococcus aureus* dalam media cair ditambahkan larutan  $H_2O_2$  3%. Reaksi positif adanya enzim katalase ditunjukkan dengan terjadinya gelembung  $O_2$  dalam larutan  $H_2O_2$  3%.

## 4.6 Penetapan kadar Larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin secara Kolorimetri (Yamana and Tsuji, 1976).

### 4.6.1 Pembuatan Larutan Pereaksi

- Pembuatan larutan NaOH 3,5 N  
Ditimbang NaOH 14,0000 gram, dilarutkan dalam air suling hingga 100,0 ml.
- Pembuatan HCl 3,5 N  
Dalam air suling 50,0 ml ditambahkan HCl 37% 29,0 ml, kemudian diencerkan dengan air suling hingga 100,0 ml.
- Pembuatan larutan Hidroksilamin HCl 3 M  
Ditimbang hidroksilamin HCl 20,8470 gram, dilarutkan dalam air suling hingga 100,0 ml dalam labu ukur.
- Pembuatan Larutan  $H_2SO_4$  0,1 N  
Dalam air suling 150,0 ml ditambahkan  $H_2SO_4$  95% 0,70 ml lalu diencerkan dengan air suling sampai 250,0 ml.

- 4000 ppm : dipipet 8,0 ml larutan baku induk 5000 ppm, dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml dan ditambahkan larutan dapar fosfat pH 8,0 hingga garis tanda.

#### **4.6.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Penentuan panjang gelombang maksimum ini digunakan dua konsentrasi larutan baku kerja masing-masing diambil 1,0 ml, ditambahkan 1,0 ml larutan hidroksilamin HCl 3M dan 1,0 ml larutan NaOH 3,5 N kemudian dibiarkan selama 3 menit pada suhu kamar. Setelah itu tambahkan 1,0 ml larutan HCl 3,5 N dan 0,5 ml larutan 35% ferri ammonium sulfat. Larutan diencerkan dengan air suling hingga 10,0 ml. Diamati serapan warna yang terjadi pada rentang panjang gelombang 400-800 nm setelah 3 menit (Yamana and Tsuji, 1976).

#### **4.6.4 Penentuan Waktu Optimum Pengamatan**

Penentuan waktu optimum pengamatan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin digunakan menggunakan larutan baku dengan kadar yang berbeda. Masing-masing larutan dipipet 1,0 ml kemudian ditambahkan 1,0 ml larutan hidroksilamin HCl 3 M dan 1,0 ml larutan NaOH 3,5 N kemudian dibiarkan 3 menit pada suhu kamar. Setelah itu ditambahkan 1,0 ml larutan HCl 3,5 N dan 0,5 ml larutan ferri ammonium sulfat 35%. Larutan tersebut diencerkan dengan air suling hingga 10,0 ml dan diamati dengan spektrofotometer UV-Vis di menit 1-5 pada panjang gelombang maksimum. Waktu optimum pengamatan diperoleh pada saat intensitas warna yang terjadi sudah stabil.

#### **4.6.5 Pembuatan Kurva Baku N-(4-klorobenzoil)sefaleksin**

Larutan baku N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan kadar 1000, 2000, 3000, 4000, dan 5000 ppm masing-masing diambil 1,0 ml, ditambahkan 1,0 ml larutan hidroksilamin HCl 3M dan 1,0 ml larutan NaOH 3,5 N kemudian dibiarkan selama 3 menit pada suhu kamar. Setelah itu tambahkan 1,0 ml larutan HCl 3,5 N dan 1,0 ml larutan 35% ferri ammonium sulfat. Larutan diencerkan dengan air suling hingga 10,0 ml. Diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva baku hubungan antara kadar (x) dan absorbansi (y), sehingga didapatkan persamaan garis regresi dan koefisien korelasinya.

#### 4.6.6 Penyiapan Larutan Uji

- Ditimbang 100,0 mg N-(4-klorobenzoil)sefaleksin kemudian dilarutkan dalam etanol secukupnya hingga larut kemudian diencerkan dengan dapar fosfat pH 8,0 hingga 25,0 ml.
- Larutan tersebut dibagi menjadi 5 bagian dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berbeda, masing-masing dipanaskan pada suhu konstan 50°C, 60°C, 70°C, 80°C dan satu tabung dibiarkan pada suhu kamar selama 1 jam.
- Reaksi degradasi dihentikan dengan cara segera mendinginkan larutan uji dalam es.

#### 4.6.7 Penentuan Kadar Larutan Uji

Dipipet 1,0 ml larutan uji kemudian ditambahkan 1,0 ml larutan hidroksilamin HCl 3 M dan 1,0 ml larutan NaOH 3,5 N kemudian dibiarkan selama 3 menit pada suhu kamar. Setelah itu tambahkan 1,0 ml larutan HCl 3,5 N dan 0,5 ml larutan ferri ammonium sulfat 35% dalam 0,1 N larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Larutan diencerkan dengan air suling hingga 10,0 ml. Diamati serapan warna yang terjadi pada panjang gelombang maksimum setelah 3 menit terhadap blanko, setelah itu serapan dimasukkan kedalam persamaan kurva baku sehingga diperoleh kadar larutan uji.

#### 4.6.8 Replikasi

Tahapan kerja penyiapan larutan uji dan penetapan kadar larutan uji dilakukan replikasi 3 kali.

#### **4.7 Penentuan Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

##### **4.7.1 Pembuatan Media Antibiotika I**

- Media Antibiotika I ditimbang sejumlah 27,0000 gram disuspensikan dalam satu liter air suling, dipanaskan hingga mendidih lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

##### **4.7.2 Pembuatan Inokulum Bakteri**

- Biakan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ditanam pada permukaan media Antibiotika I secara merata, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Satu ose koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari biakan padat disuspensikan dalam larutan natrium klorida isotonis sebanyak 5 ml.
- Serapan suspensi bakteri diukur dengan spektrofotometer tampak pada panjang gelombang 580 nm sedemikian rupa sehingga diperoleh transmittan 25 %.
- Sebagai blanko adalah natrium klorida isotonis.

##### **4.7.3 Penentuan Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji**

- Inokulum bakteri 50µL dimasukkan dalam cawan petri dengan diameter 9 cm secara aseptis.
- Media antibiotik steril sebanyak 18 ml suhu 45-50°C dituang kedalam cawan petri yang berisi inokulum bakteri.
- Campuran media dan inokulum bakteri dibuat homogen dengan menggerakkan cawan petri beberapa kali secara teratur dan selanjutnya dibiarkan memadat.
- Larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin diteteskan kedalam silinder logam sebanyak 150µL.
- Kemudian didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar.
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Diameter daerah hambatan diukur dengan mengukur daerah jernih dengan menggunakan jangka sorong. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali.

## 4.8 Analisis Data

### 4.8.1 Hubungan antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Dari data baku kerja dengan serapan yang dihasilkan dilakukan perhitungan sehingga diperoleh persamaan regresi kurva baku :

$$y = bx + a \dots\dots\dots (1)$$

$$r = \dots\dots\dots$$

Pemanasan larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin 4000 ppm pada suhu 50°C, 60°C, 70°C, 80°C selama satu jam dan suhu kamar yang didiamkan selama satu jam, kemudian serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum.

Nilai absorbansi yang diperoleh dimasukkan dalam persamaan regresi kurva baku (1) sehingga diperoleh kadar senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.

Pada uji mikrobiologi secara difusi silinder, hasil yang didapatkan adalah diameter daerah hambatan.

Untuk mengetahui korelasi antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin (x) dengan diameter daerah hambatan (y) dibuat persamaan regresi :

$$y = bx + a \dots\dots\dots (2)$$

$$r = \dots\dots\dots$$

Dari persamaan regresi (2) yang didapatkan, dicari harga koefisien korelasi (r). Setelah itu r hitung dibandingkan dengan r tabel, bila r hitung lebih besar dari r tabel berarti variabel x dan y mempunyai korelasi yang linier.

Evaluasi terhadap persamaan garis regresi dilakukan dengan uji anova. Bila F hitung lebih besar daripada F tabel, maka ada korelasi yang bermakna antara variabel x dan variabel y. Sebaliknya bila F hitung lebih kecil daripada F tabel, berarti tidak ada korelasi yang bermakna antara variabel x dan y.



## BAB V

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Pemeriksaan Kualitatif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Pemeriksaan kualitatif yang dilakukan terhadap N-(4-klorobenzoil)sefaleksin adalah pemeriksaan organoleptis. Selain itu juga dilakukan uji kemurnian terhadap N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yaitu penentuan jarak lebur dan kromatografi lapis tipis. Hasil pemeriksaan kualitatif senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dapat dilihat pada tabel 5.1; 5.2 ; 5.3

Tabel 5.1  
Hasil Pemeriksaan Organoleptis N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Pemeriksaan	Hasil pengamatan	Pustaka (Hardjono.S.;2002)
Organoleptis		
a. bentuk	Seperti kapas	Seperti kapas
b. bau	Putih tulang	Putih tulang
c. warna	Khas	Khas

Tabel 5.2  
Hasil Pemeriksaan Jarak Lebur N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Hasil pengamatan jarak lebur (°C)			Rata-rata (°C)	Data pustaka (°C) (Hardjono.S.;2002)
187-189	186-190	187-190	186-190	187-190

Tabel 5.5  
Serapan Kompleks feri-N-(4-klorobenzoil)sefaleksin hidroksamat Pada Berbagai Panjang Gelombang

$\lambda$ (nm)	Nilai serapan	
	2000 ppm	4000 ppm
446	0,503	0,711
447	0,508	0,726
448	0,520	0,748
<b>449</b>	<b>0,559</b>	<b>0,762</b>
450	0,542	0,738
451	0,529	0,726
452	0,516	0,713

Dari data tabel diatas, serapan maksimum diperoleh pada  $\lambda = 449$  nm.

#### 5.4 Penentuan Waktu Optimum Pengamatan

Penentuan waktu optimum pengamatan dilakukan dengan mengamati serapan kompleks feri-N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada tiap menit, yaitu pada menit ke-2 sampai menit ke-7, pada panjang gelombang 449,0 nm diketahui bahwa kompleks feri-N-(4-klorobenzoil)sefaleksin hidroksamat memberikan warna yang stabil mulai menit ke-3.

#### 5.5 Penetapan Kadar Senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin Secara Kolorimetri

Penetapan kadar senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin menggunakan dua kurva baku. Yang pertama untuk penetapan kadar larutan uji pada suhu kamar, 50°C dan 60°C, sedangkan untuk suhu 70°C dan 80°C dibuat kurva baku yang lain. Hasil penetapan kadar larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dicari dari persamaan kurva baku. Replikasi yang dilakukan sebanyak tiga kali.

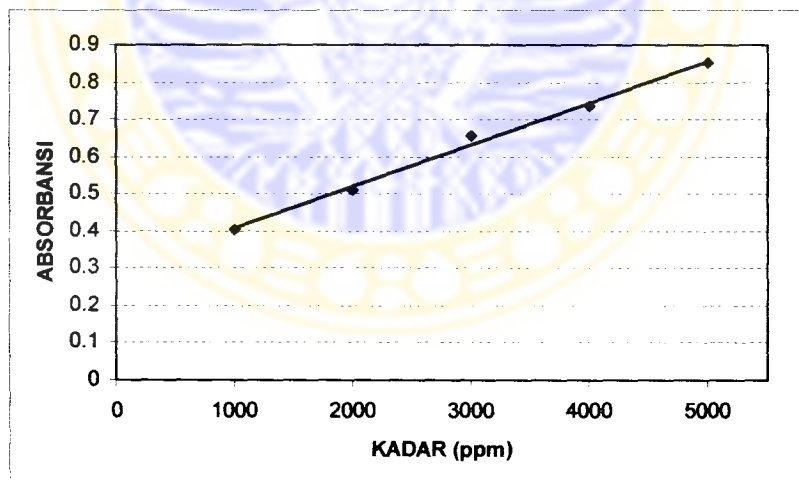
### 5.5.1 Pembuatan Kurva Baku I Larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Data kurva baku I larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dapat dilihat pada tabel 5.6

Tabel 5.6  
Nilai serapan dan kadar larutan baku N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Kadar baku kerja (ppm)	Serapan
1000	0,404
2000	0,508
3000	0,655
4000	0,738
5000	0,851

Dari data tersebut diperoleh persamaan regresi  $y = 1,124 \times 10^{-4}x + 0,294$  dan didapatkan harga  $r = 0,9970$  pada  $\alpha = 0,05$ . Kurva hubungan kadar terhadap serapan dari larutan baku N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dapat dilihat pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Kurva hubungan kadar terhadap serapan dari larutan baku N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

#### 5.5.1.2 Penetapan Kadar Larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Penetapan kadar larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada suhu kamar, 50°C, 60°C dicari dari persamaan kurva baku I. Dari serapan yang diperoleh kemudian dapat dihitung kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

melalui persamaan garis regresi yang diperoleh. Hasil penetapan kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin secara kolorimetri dapat dilihat pada tabel 5.7

Tabel 5.7  
Hasil Penentuan Kadar Pada Berbagai Perlakuan Suhu Kamar, 50°C, 60°C  
dengan persamaan kurva baku  $y = 1,124 \times 10^{-4}x + 0,294$

Suhu (°C)	Serapan	Kadar hasil perhitungan (ppm)	Kadar (%)
Suhu kamar			
1	0,722	3807,83	95,20
2	0,709	3692,17	92,30
3	0,711	3709,96	92,74
50			
1	0,655	3211,74	80,29
2	0,658	3238,43	80,96
3	0,655	3185,05	79,63
60			
1	0,584	2580,07	64,50
2	0,580	2544,48	63,61
3	0,586	2597,86	64,94

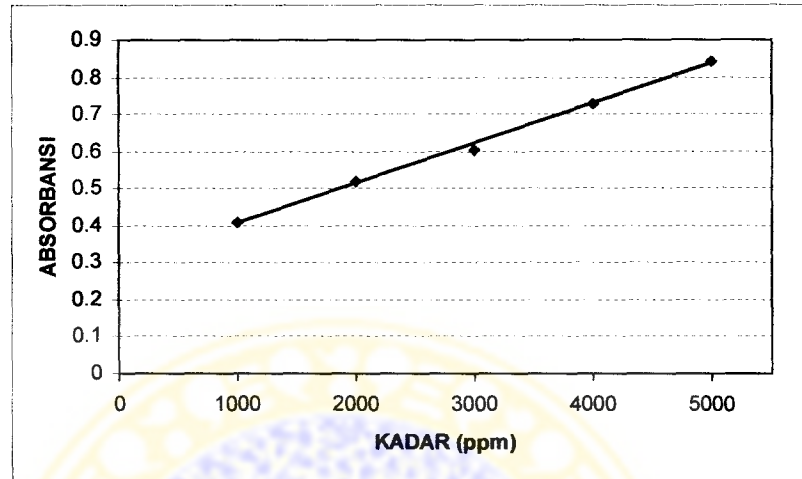
### 5.5.1.3 Pembuatan Kurva baku II Larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Data kurva baku II larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dapat dilihat pada tabel 5.8

Tabel 5.8  
Nilai Serapan dan Kadar Larutan Baku II N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Kadar baku kerja (ppm)	Serapan
1000	0,409
2000	0,520
3000	0,605
4000	0,728
5000	0,843

Dari data tersebut diperoleh persamaan regresi  $y = 1,076 \times 10^{-4}x + 0,2982$  dan didapatkan harga  $r = 0,9984$  pada  $\alpha = 0,05$ . Kurva hubungan kadar terhadap serapan dari larutan baku II N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dapat dilihat pada gambar 5.2



Gambar 5.2 Kurva hubungan kadar terhadap serapan dari larutan baku N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

#### 5.5.1.4 Penetapan Kadar Larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin

Penetapan kadar larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada suhu 70°C, 80°C, dicari dari persamaan kurva baku II. Dari serapan yang diperoleh kemudian dapat dihitung kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin melalui persamaan garis regresi yang diperoleh. Hasil penetapan kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin secara kolorimetri dapat dilihat pada tabel 5.9



### 5.6 Penentuan Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Hasil penentuan diameter daerah hambatan larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tercantum dalam tabel 5.11

Tabel 5.11  
Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada Berbagai Kadar Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Suhu (°C)	Diameter Daerah Hambatan (mm)			Rata-rata (mm)
	1	2	3	
kamar	31,16	31,04	31,15	31,12
50	28,04	28,88	28,54	28,48
60	26,32	26,56	26,44	26,44
70	23,24	23,04	23,26	23,80
80	21,92	20,92	21,74	21,52

### 5.7 Hubungan Antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada Berbagai Suhu Dengan Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Untuk mengetahui ada tidaknya korelasi antara kadar senyawa aktif yang ditetapkan secara kolorimetri dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 digunakan uji korelasi linier dengan persamaan garis regresi. Sebagai variabel x adalah kadar rata-rata senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin pada berbagai suhu yang ditetapkan secara kolorimetri dan variabel y adalah rata-rata diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabel 5.12  
Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dan Diameter Daerah Hambatan Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri (ppm) x	Diameter daerah hambatan (mm) y
3736,65	31,12
3211,74	28,48
2574,14	26,44
2123,29	23,80
1727,06	21,52

Dari data tersebut dapat dihitung koefisien korelasi antar x dan y dengan menggunakan rumus regresi. Dari hasil perhitungan dengan menggunakan program SPSS 12 diperoleh harga  $r=0,9950$  ( $n=5$  ;  $\alpha=0,05$  ;  $db=3$  ;  $r$  tabel= $0,878$ ). Dari hasil didapatkan bahwa ada korelasi linier antara variabel x dan y yang dinyatakan dalam persamaan garis regresi  $y= 4,635 \times 10^{-3}x + 13,874$

Kelinieran persamaan garis regresi tersebut dievaluasi dengan menggunakan uji anova dan diperoleh F hitung =  $271,941$  ( $n=5$  :  $\alpha=0,05$  ; harga F tabel= $10,13$ ). Maka dapat dilihat bahwa harga F hitung lebih besar dari harga F tabel, berarti ada korelasi linier antara variabel x dan y. Gambar kurva hubungan antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada gambar 5.3

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mencari hubungan kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan sebagai diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang digunakan dalam penelitian ini merupakan senyawa baru hasil modifikasi struktur turunan sefaleksin dengan mereaksikan gugus N-amino dari sefaleksin dengan gugus 4-klorobenzoil dari turunan benzoil klorida yang menghasilkan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin. Dari hasil uji kualitatif yang meliputi uji organoleptis, KLT, dan titik lebur, senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin memenuhi persyaratan seperti yang tercantum dalam pustaka (Hardjono.S.;2002), sehingga senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin masih dapat digunakan sebagai senyawa uji.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pada pewarnaan Gram, tes koagulase, dan tes agar garam manitol menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tersebut sesuai dengan data pustaka (Benson; 1998) dan (Prescott *et al.*, 2002), sehingga dapat digunakan sebagai bakteri uji pada penelitian ini.

Untuk mendapatkan hubungan antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan aktivitas antibakterinya, diperlukan suatu larutan uji yang terdiri dari senyawa aktif dengan berbagai macam kadar. Yang dimaksud senyawa aktif disini adalah N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan cincin  $\beta$ -laktam yang masih utuh. Untuk mendapatkan campuran larutan dengan kadar aktif yang berbeda-beda maka dilakukan pemanasan larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin selama 1 jam pada suhu 50 °C, 60 °C, 70 °C dan 80 °C serta tanpa pemanasan (suhu kamar). Larutan uji dibuat kadar 4000 ppm agar harga serapan larutan uji setelah pemanasan tetap berada dalam rentang kurva baku. Untuk mencegah degradasi lebih lanjut maka larutan uji setelah proses pemanasan langsung didinginkan dalam es. Pada umumnya pemanasan dilakukan untuk mempercepat

proses peruraian suatu senyawa, oleh karena itu metode ini lazim digunakan digunakan secara cepat untuk memprediksi stabilitas suatu obat. Dengan pemanasan diharapkan senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin akan mengalami peruraian, cincin  $\beta$ -laktam akan terbuka atau tidak utuh lagi, sehingga dari hasil pemanasan tersebut akan diperoleh campuran senyawa aktif dan tidak aktif dari senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.

Dalam setiap penetapan kadar larutan uji pada suhu kamar, 50°C, 60°C dilakukan pembuatan kurva baku dari larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin. Sedangkan untuk suhu 70°C dan 80°C juga dilakukan pembuatan kurva baku sehingga untuk penetapan kadar senyawa aktif menggunakan dua kurva baku. Hal ini dilakukan karena dalam setiap kali penetapan kadar senyawa uji dalam satu hari hanya bisa dilakukan untuk beberapa suhu pemanasan saja dengan replikasi sebanyak tiga kali.

Pada penelitian ini, penetapan kadar larutan uji dilakukan dengan metode kolorimetri melalui pembentukan kompleks berwarna dengan ion feri yang serapannya dapat diukur secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis. Metode ini dipilih karena merupakan metode sederhana dan spesifik terhadap cincin  $\beta$ -laktam. Hidroksilamin hanya bereaksi dengan senyawa yang memiliki cincin  $\beta$ -laktam utuh, kemudian setelah direaksikan dengan ion feri akan menghasilkan warna dan serapannya dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

Serapan maksimum dari larutan N-(4-klorobenzoil)sefaleksin adalah pada panjang gelombang maksimum 449,0 nm. Untuk selanjutnya penetapan kadar senyawa N-(4-klorobenzoil)sefaleksin menggunakan panjang gelombang maksimum tersebut.

Berdasarkan optimasi waktu pengamatan dari menit ke-2 sampai menit ke-7, intensitas warna yang terbentuk dari hasil reaksi dengan pereaksi hidroksilamin-Fe stabil pada menit ke-3. oleh karena itu dalam penelitian ini pengukuran serapan dilakukan pada menit ke-3 setelah penambahan pereaksi terakhir.

Pada penetapan kadar secara kolorimetri dalam penelitian ini tidak ditentukan suatu larutan standar N-(4-klorobenzoil)sefaleksin karena senyawa ini merupakan senyawa baru. Berat tiap-tiap sampel yang ditimbang diasumsikan



sebagai kadar 100% dari larutan uji. Jadi persen kadar larutan uji yang didapatkan setelah perlakuan pada berbagai suhu merupakan angka relatif terhadap kadar larutan mula-mula.

Pada uji mikrobiologis secara difusi harus diperhatikan beberapa faktor yang mempengaruhi diameter daerah hambatan, antara lain kepekaan bakteri, jumlah inokulum bakteri, kadar larutan uji, suhu dan lama inkubasi. Semakin peka bakteri yang dipakai, maka akan memberikan diameter daerah hambatan yang semakin besar.

Sefaleksin peka terhadap kuman Gram positif terutama *Staphylococcus aureus*, begitu juga senyawa turunan sefaleksin seperti N-(4-klorobenzoil) sefaleksin, sehingga dalam penelitian ini dipakai *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 agar dapat memberikan hasil pengamatan yang terbaik.

Untuk memperoleh jumlah inokulum bakteri yang memenuhi syarat untuk uji aktivitas maka dilakukan pengukuran terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan cara mengukur transmittan suspensi bakteri dalam natrium klorida isotonis. Pengenceran tertentu dengan larutan natrium klorida isotonis didapatkan transmittan 25% untuk suspensi bakteri tersebut yang dibandingkan dengan blanko larutan natrium klorida isotonis sebagai transmittan 100 %. Untuk mendapatkan jumlah inokulum bakteri yang sesuai, dilakukan orientasi terhadap jumlah inokulum bakteri dari 50  $\mu$ l – 100  $\mu$ l. Hasil orientasi menunjukkan bahwa pada inokulum kuman 50  $\mu$ l didapatkan diameter daerah hambatan yang jelas dan mudah diamati.

Untuk inkubasi digunakan suhu 37°C, karena pada suhu tersebut termasuk suhu optimum untuk pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, sedangkan lama inkubasi akan mempengaruhi besarnya diameter daerah hambatan yang dihasilkan. Oleh karena itu dilakukan orientasi selama inkubasi 24-48 jam. Inkubasi selama 48 jam menunjukkan diameter daerah hambatan yang kecil dan kurang jelas daripada diameter daerah hambatan dengan lama inkubasi 24 jam, karena inkubasi selama 48 jam telah memberikan kesempatan pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 untuk melakukan pertumbuhan.

Hasil yang teramati pada penelitian ini adalah semakin tinggi suhu pemanasan maka semakin rendah kadar senyawa aktif karena terjadinya degradasi



dari larutan uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin, sehingga diameter daerah hambatan yang dihasilkan semakin kecil.

Untuk menganalisis hubungan antara kadar N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan analisis regresi. Hasil yang didapat adalah korelasi linier berupa persamaan garis lurus dengan persamaan regresi  $y = 4,635 \times 10^{-3}x + 13,874$  dengan  $r = 0,9950$  ( $n=5$ ;  $\alpha=0,05$ ;  $db=3$  ;  $r$  tabel= $0,878$ ).

Kelinieran persamaan garis regresi tersebut dievaluasi dengan menggunakan uji anava dan diperoleh F hitung = 271,941 ( $n=5$ ;  $\alpha=0,05$ ;  $db=3$  ; F tabel= $10,13$ ). Harga F hitung lebih besar dari harga F tabel, berarti ada korelasi linier antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yang ditunjukkan dengan diameter daerah hambatan.

Dari hubungan diatas dapat diketahui bahwa penetapan kadar secara kolorimetri dapat menggambarkan aktivitas antibakterinya.

## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan analisis data maka dapat disimpulkan :

Ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara kolorimetri dengan aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dinyatakan dengan persamaan regresi  $y = 4,635 \times 10^{-3}x + 13,874$  dengan  $r = 0,9950$  ( $n = 5$  ;  $\alpha = 0,05$  ;  $db = 3$  ;  $r \text{ tabel} = 0,878$ ).

#### 7.2 Saran

Metode kolorimetri dapat dipakai untuk penetapan kadar senyawa aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1990. *The United States Pharmacopoeia*. 22<sup>nd</sup> ed., Rokville: The United States Pharmacopoeia Convention Inc., pp.1488-1493.
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal.891-892, 895-896.
- Benson, H.J., 1998. *Microbiological Applications, laboratory Manual in General Microbiology*, 7<sup>th</sup> ed, Boston: Mc.Graw Hill. pp.58-78
- Black, Jacquelin. G., 1999. *Microbiology : Principles and Exploration*, 4<sup>th</sup> ed, New Jersey: Prentice Hall Inc, pp.351-357.
- Bonang, G., Enggar, S. K., 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT. Gramedia, hal.12, 56-78.
- Dinner, A., 1977, Cephalosporin Degradation, *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 20, No. 7, pp.963-965.
- Edberg, S. C., Berger, S. A., 1980. Terjemahan Sanusi C., Andrianto P., *Antibiotika dan Infeksi*, Jakarta: CV EGC, hal.199-208.
- Florey, K., 1975. *Analytical Profiles Drug Substances*. Vol. IV. New York: Academic Press, pp.21-48.
- Gan, V. H. S. dan Isdiantoro, Y. H., 1995. Penisilin, Sefalosporin dan Antibiotika betalaktam Lainnya, dalam: Ganiswara, S.G. (Editor), *Farmakologi dan Terapi*, edisi ke-4, Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal.622-642.
- Gillespie, S. H., 1994. *Medical Microbiology Illustrated* , Oxford: Butterworth-Heinemann ltd, pp.12-19.
- Gilman, A. G., Goodman, L. S., 1970. *The Pharmacological Basic of Therapeutics*, 4<sup>th</sup> ed., London: The Mac Millan Company, pp.1277-1282.
- Hardjono, S., 2002. *Sintesis Senyawa Baru Turunan Benzoid Sefaleksin Untuk Meningkatkan Aktivitas Antibakteri Terhadap Pseudomonas aeruginosa*. Laporan Riset Unggulan Terpadu VIII Bidang Ilmu Kimia dan Proses. Jakarta: Kementrian Riset dan Teknologi Republik Indonesia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, hal.12, 17, 19.
- Jawetz, Melnick and Adelberg's, 1991. *Medical Microbiology*, 19<sup>th</sup> ed, Connecticut: Prentice Hall International Inc, pp.194-199.

- Kolthoff, I. M., Sandell, E. B., 1952. *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis*, 3<sup>rd</sup> ed, New York: The Mac Millan Company, pp.585-594.
- Lim, D., 1998. *Microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed, Boston: McGraw Hill, pp.319-320.
- Mackie, Colle J. G., 1986. *Practical Microbiology*, In: Microbial Infection, 13<sup>th</sup> ed, Vol. I, Edinburg, London, Melbourne, New York: Churchill Living Stone, pp.253-257.
- Marelli, L.P., 1975. Cephalexin, in Florey, K.(Eds.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol.4., New York: Academic Press, pp.22-37
- Martin, A. R., 1982. Antibiotika. In: Doerge, R. F., Phd., Fatah, A. M., terjemahan: *Buku Teks Wilson and Gisvold Kimia Farmasi dan Medisinal Organik*, Semarang: IKIP Semarang Press, hal.231-260.
- Nogrady, T., 1982. Rasyid, R., Musadad, A., terjemahan: *Kimia Medisinal Pendekatan Secara Biokimia*, edisi ke-2, Bandung: Institut Teknologi Bandung, hal.437-447.
- Presscott, L.M., Harey, J.P., Klein, D.A, 2002. *Microbiology*. 5<sup>th</sup> ed., Boston: McGraw–Hill Higher Education, pp 835-837.
- Rawlins, E. A., 1988. *Bentley's Textbook of Pharmaceutics*, 8<sup>th</sup> ed, London: University Printing House, pp.435, 602-603.
- Reynold, J. E. F., 1989. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 29<sup>th</sup> ed, London: The Pharmaceutical Press, pp.105, 173-175.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. *Kimia Medisinal*, jilid 2, Surabaya: Airlangga University Press, hal.110-136.
- Tjay, T. H., Rahardjo, K., 1979., *Obat-obat Penting Khasiat dan Penggunaan dan Efek-efeknya*, Edisi ke-3, Jakarta: Percetakan Jayakarta, hal.63-64.
- Wattimena, J.R., Nelly, C. S., Mathilda, B. W., Ellin, Y. S., Andrianus 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. H. and Tsuji A., 1976. Comparative Stability of Cephalosporin in Aqueous Solution: Kinetics and Mecanism of Degradation. *Journal of Pharmaceutical Science*, Vol. 65, pp.1563-1573.

## Lampiran 1

## Sertifikat Analisis Senyawa N-(4-Klorobenzoil)sefaleksin

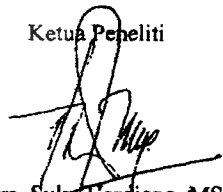
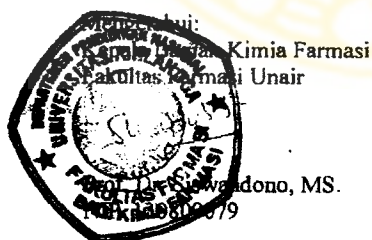
Laporan Hasil Pemeriksaan Senyawa

1. Nama senyawa : N-(4-Klorobenzoil)sefaleksin  
 2. Dibuat oleh : Drs. Suko Hardjono, MS  
 3. Tanggal dibuat : 21 Agustus 2005  
 4. Rendemen : 60%  
 5. Pemeriksaan :

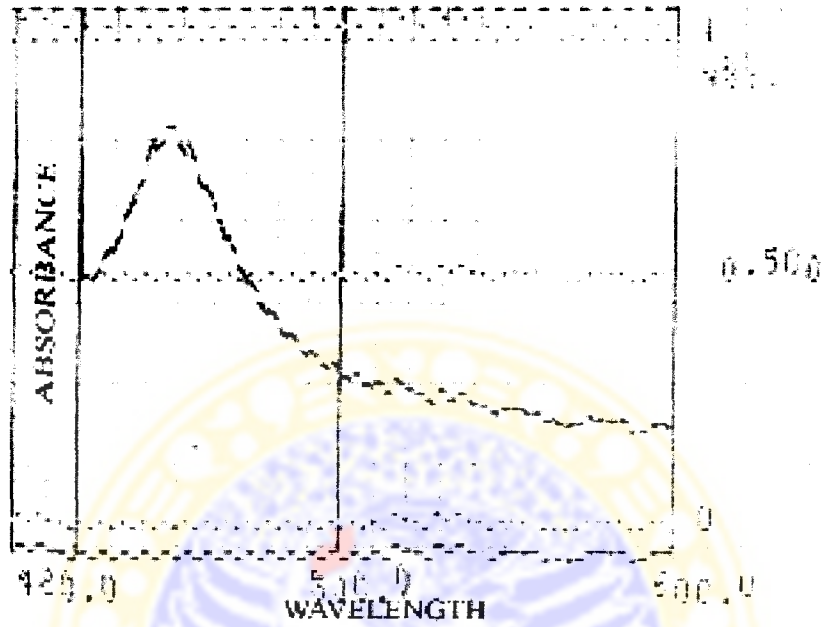
No.	Jenis Pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan
1.	Pemerian/Organoleptis	Bentuk amorf, warna kuning muda.
2.	Jarak lebur	187-189°C
3.	Kelarutan	metanol, etanol, aseton, kloroform, dan dimetilsulfoksida
4.	Uji KLT(3 eluen)	1 noda.
5.	Identifikasi UV Dalam pelarut metanol	$\lambda$ maks = 204; 238 nm
6.	Identifikasi IR $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) Dalam pelet KBr	3430 dan 3272 (-N-H); 3059 dan 2569 (-C-H); 1761 (-C=O $\beta$ -laktam); 1670 (-C=O amida); 1637 (-C=O asam karboksilat); 1543 (-C-H aromatis)
7.	Identifikasi $^1\text{H}$ NMR $\delta$ (ppm) Dalam pelarut $\text{CD}_3\text{OD}$	1,98, s, C-CH <sub>3</sub> ; 2,98-3,03, d, C-CH <sub>2</sub> ; 3,21, d, N-C-CH-S; 3,27, d, N-CH-C-S; 4,79, d, C-NH-C; 5,56, d, Ar-CH-N-; 5,64, d, C-NH-CO-Ar; 7,188-7,676, m, 2 Ar-H
8.	Kesimpulan :	Senyawa adalah N-(4-Klorobenzoil)sefaleksin Ada pengotor pelarut etilasetat

Surabaya, 13 Agustus 2007

Ketua Peneliti

  
 Drs. Suko Hardjono, MS  
 NIP. 130355370




**Lampiran 2****Spektra Serapan Panjang Gelombang Maksimum  
N-(4-Klorobenzoil) Sefaleksin**

### Lampiran 3

#### Perhitungan Uji Regresi dan Uji Distribusi F antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin terhadap serapannya. Kurva baku I

### Regression

#### Variables Entered/Removed<sup>a</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	KADAR <sup>a</sup>		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: ABSORBAN

#### Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,997 <sup>a</sup>	,994	,992	1,58E-02

a. Predictors: (Constant), KADAR

#### ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,126	1	,126	508,605	,000 <sup>a</sup>
	Residual	7,452E-04	3	2,484E-04		
	Total	,127	4			

a. Predictors: (Constant), KADAR

b. Dependent Variable: ABSORBAN

#### Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,294	,017		17,786	,000
	KADAR	1,124E-04	,000	,997	22,552	,000

a. Dependent Variable: ABSORBAN

## Lampiran 4

**Perhitungan Uji Regresi dan Uji Distribusi F antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin terhadap Serapannya. Kurva baku II**

## Regression

Variables Entered/Removed<sup>a</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	KADAR <sup>a</sup>		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: ABSORBAN

## Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,998 <sup>a</sup>	,997	,996	1,09E-02

a. Predictors: (Constant), KADAR

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,116	1	,116	974,559	,000 <sup>a</sup>
	Residual	3,564E-04	3	1,188E-04		
	Total	,116	4			

a. Predictors: (Constant), KADAR

b. Dependent Variable: ABSORBAN

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,298	,011		26,086	,000
	KADAR	1,076E-04	,000	,998	31,218	,000

a. Dependent Variable: ABSORBAN

## Lampiran 5

### Perhitungan Uji regresi dan Uji Distribusi F antara Kadar Senyawa Aktif N-(4-klorobenzoil)sefaleksin dengan Aktivitasnya terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

#### Regression

##### Variables Entered/Removed<sup>a</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	KADAR <sup>a</sup>		Enter

- a. All requested variables entered.  
b. Dependent Variable: ABSORBAN

##### Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,995 <sup>a</sup>	,989	,985	,455715

- a. Predictors: (Constant), KADAR

##### ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	56,476	1	56,476	271,941	,000 <sup>a</sup>
	Residual	,623	3	,208		
	Total	57,099	4			

- a. Predictors: (Constant), KADAR  
b. Dependent Variable: ABSORBAN

##### Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	13,874	,779		17,812	,000
	KADAR	4,635E-03	,000	,995	16,491	,000

- a. Dependent Variable: ABSORBAN

## Lampiran 6

Tabel Harga r

Tabel r

DEGREES OF FREEDOM (DF)	5 PERCENT	1 PERCENT	DEGREES OF FREEDOM (DF)	5 PERCENT	1 PERCENT
1	.997	1.000	24	.388	.496
2	.950	.990	25	.381	.487
3	.878	.959	26	.374	.478
4	.811	.917	27	.367	.470
5	.754	.874	28	.361	.463
6	.707	.834	29	.355	.456
7	.666	.798	30	.349	.449
8	.632	.765	35	.325	.418
9	.602	.735	40	.304	.393
10	.576	.708	48	.288	.372
11	.553	.684	50	.273	.354
12	.532	.661	60	.250	.325
13	.514	.641	70	.232	.302
14	.497	.623	80	.217	.283
15	.482	.606	90	.205	.267
16	.468	.590	100	.195	.254
17	.456	.575	125	.174	.228
18	.444	.561	150	.159	.208
19	.433	.549	200	.138	.181
20	.423	.537	300	.113	.148
21	.413	.526	400	.098	.128
22	.404	.515	500	.088	.115
23	.396	.505	1000	.062	.081



## Lampiran 7

Tabel Harga F pada Derajat Kepercayaan 95%

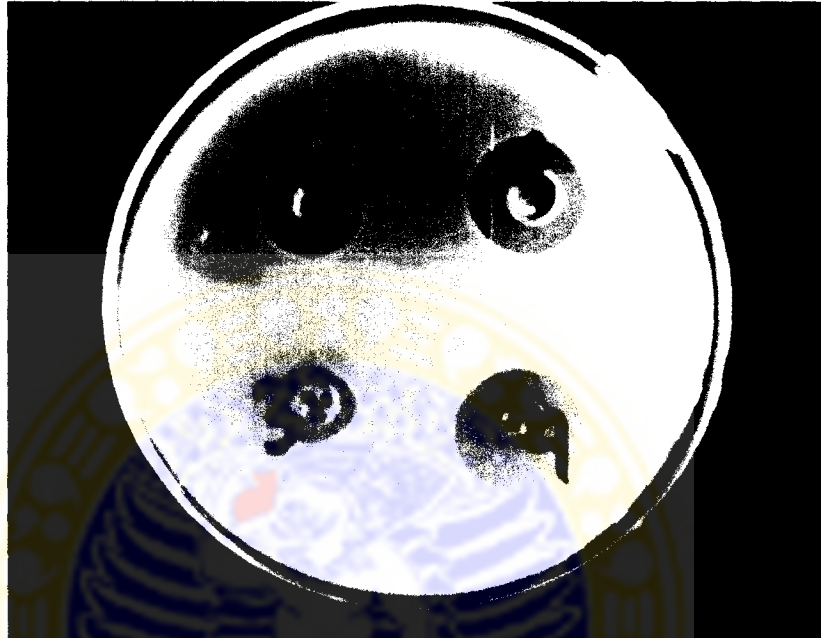
*(Table J continued)*

$F_{.95}$

Denominator Degrees of Freedom	Numerator Degrees of Freedom								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88

## Lampiran 8

### Gambar Diameter Daerah Hambatan larutan Uji N-(4-klorobenzoil)sefaleksin Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



#### Keterangan:

1. Larutan Uji pada pemanasan 60°C
2. Larutan Uji pada pemanasan 50°C
3. Larutan Uji pada pemanasan 70°C
4. Larutan Uji pada suhu kamar

## Lampiran 9

Surat Keterangan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

BAGIAN KIMIA FARMASI  
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

No. 147/JO3.1.20/PP/2007

28 Agustus 2007

## SURAT KETERANGAN


Berdasarkan Surat Keterangan dari Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, menerangkan bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dibenarkan kepada : Ketut Gde Udrayana Paundra.

Untuk selanjutnya bakteri tersebut dipergunakan pada uji aktivitas antibakteri pada penelitian skripsi mahasiswa atas nama :

1. Ketut Gde Udrayana Paundra NIM : 050312894
2. Fitria Muslimah Putri NIM : 050312875
3. Diah Catur L. Nisa NIM : 050312817

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk digunakan sepenuhnya.

Kepala,

  
Prof. Dr. Siswando, MS., Apt  
NIP. 130809079

Kampus B. Jl. Darmawangsa Dalam, Surabaya 60286. Telp. 031 5033710