

SKRIPSI

MADE ROSIANA KUSMALANTARI

**STUDI HUBUNGAN ANTARA KADAR SENYAWA
AKTIF N-(3,4-DIKLOROBENZOIL)SEFALEKSIN
(SECARA IODOMETRI) DENGAN
AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
Staphylococcus aureus ATCC 25923**



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2004**

Lembar Pengesahan

**STUDI HUBUNGAN ANTARA KADAR SENYAWA
AKTIF N-(3,4-DIKLOROBENZOIL)SEFALEKSIN
(SECARA IODOMETRI) DENGAN
AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

SKRIPSI

**DIBUAT UNTUK MEMENUHI SYARAT MENCAPAI GELAR SARJANA
FARMASI PADA FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

OLEH :

**MADE ROSIANA KUSMALANTARI
050012223**

DISETUJUI OLEH :

**Drs. Bambang Tri Purwanto, MS
Pembimbing Utama**

**Prof. Dr. Siswandono, MS
Pembimbing Serta I**

**Drs. Suko Hardjono, MS
Pembimbing Serta II**

KATA PENGANTAR

OM SWASTIASTU,

Segala puji bagi Ida Sang Hyang Widhi Wasa yang telah melimpahkan segala nikmat, karunia dan petunjuk-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul :

Studi Hubungan antara Kadar Senyawa Aktif N-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin (secara Iodometri) dengan Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

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

Dengan segenap rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih yang tiada hingga kepada :

1. Bapak Drs. Bambang Tri Purwanto, MS selaku pembimbing utama, serta Bapak Dr. Siswandono, MS dan Bapak Drs. Suko Hardjono, MS selaku pembimbing serta yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, saran dan nasehat yang bermanfaat dalam penyelesaian skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. I G N Astika dan Bapak Drs. Achmad Toto Poernomo, Msi selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang berguna untuk perbaikan skripsi ini.
3. Bapak Prof. Dr. H. Purwanto selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan kepada penulis selama mengikuti pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
4. Segenap Staf Pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang membantu terselesaikannya tugas ini.
5. Ayah dan Ibu tercinta atas doa dan perhatiannya, Kristina (kakakku), Wide (kakak ipar), Komang Trysna (adikku) atas dorongan moril yang diberikan, dan Putu Anggita (keponakanku) atas keceriaan yang diberikan, sehingga menumbuhkan kembali semangat penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

6. Sahabat terbaikku, Dwi Yunyathi yang manis, yang selalu setia mendengarkan segala keluh kesahku.
7. Sahabat-sahabatku di Fakultas Farmasi Eko', Pitri, Dhyana, Dayu atas kebersamaan dan kemitraannya.
8. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Kimia Medisinal yaitu Nike, Emi, Avri, Nia, Yusi, Melani, Tyas, Danang dan Mas Wachid atas kerja samanya dalam penyelesaian skripsi ini.
9. Semua pihak, yang tidak bisa disebutkan satu per satu, yang telah membantu penelitian dan penulisan skripsi ini.

Tidak ada satupun yang sempurna kecuali Ida Sang Hyang Widhi Wasa, kebenaran itupun datang dari-Nya. Semoga skripsi yang masih banyak kekurangan ini dapat memberi manfaat khususnya pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

OM SANTIHI SANTIHI SANTIHI OM

Surabaya, Juli 2004

Penulis

**Studi Hubungan antara Kadar Senyawa Aktif
N-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin (secara Iodometri)
dengan Aktivitas Antibakteri terhadap
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

RINGKASAN

Made Rosiana Kusmalantari

Sefaleksin merupakan senyawa semi sintetik dari generasi pertama sefalosporin dan dapat diberikan secara per oral karena adanya gugus α -amino pada struktur dasar menyebabkan senyawa tahan terhadap asam lambung. Sefaleksin digunakan terutama untuk pengobatan infeksi saluran kemih karena sedikit diikat oleh protein plasma dan sebagian besar diekskresikan melalui ginjal dalam bentuk tak berubah.

Untuk mendapatkan senyawa turunan baru sefaleksin yang memiliki stabilitas dan aktivitas lebih baik, telah dilakukan sintesis senyawa-senyawa turunan dari sefaleksin. Salah satu senyawa hasil sintesis yang dilakukan oleh Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga adalah senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin, yang diperoleh dari hasil sintesis dengan menambahkan gugus 3,4-diklorobenzoil pada gugus *N*-amino dari sefaleksin.

Sebagai turunan dari sefaleksin, aktivitas *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin sebagai antibakteri ditentukan oleh bentuk utuh dari struktur inti β -laktamnya. Jika struktur ini terbuka akan menyebabkan penurunan aktivitas antibakteri, atau bahkan aktivitas antibakteri hilang, sehingga efek terapi yang diinginkan tidak tercapai.

Ada persamaan konsep antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri yaitu sama-sama berdasarkan jumlah cincin β -laktam utuh, makin banyak cincin β -laktam yang utuh maka makin besar kadar senyawa aktif dan makin besar pula aktivitas antibakteri *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin. Permasalahan yang ada : apakah ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Untuk membuktikannya dilakukan penelitian dengan tujuan untuk menjelaskan adanya hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Penelitian ini dilakukan pada berbagai kadar senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang belum terurai. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan melarutkan *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam pelarut campuran metanol-air (7 : 3), pada suhu kamar dan hasil pemanasan larutan uji tersebut pada

suhu 50 °C, 60 °C, 70 °C, dan 80 °C selama 3 jam. Replikasi percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

Penentuan kadar larutan uji dilakukan secara kimia dan secara mikrobiologi untuk menentukan ada hubungan yang linier antara keduanya. Penentuan kadar larutan uji secara kimia dilakukan dengan metode iodometri, sedangkan secara mikrobiologi dilakukan dengan metode difusi silinder menggunakan media Antibiotika-1.

Hasil penelitian dan analisis data menggunakan uji regresi pada $\alpha = 0,05$ menunjukkan adanya hubungan linier yang bermakna antara kadar *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin secara iodometri (variabel *x*) dan secara mikrobiologi (variabel *y*). Hubungan ini dinyatakan dengan persamaan garis $y = 0,186 x + 9,335$ ($n = 3$; $r = 0,961$; $F = 35,995$) untuk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Bertitik tolak dari penelitian ini maka untuk selanjutnya perlu dilakukan uji mikrobiologi senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin terhadap bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif yang lain.

**Relation Study between the Level of Active Compound
N-(3,4-dichlorobenzoyl)cephalexin (by Iodometry)
with Antibacterial Activity to *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

ABSTRACT

Research as a mean to explain relation between the level of active compound *N*-(3,4-dichlorobenzoyl)cephalexin by iodometry with inhibition area diameter to *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 has been done.

Determination the level of active compound was done chemically and antibacterial activity was done microbiologically to determine the existence of linear relation among both. Determination the level of active compound was chemically done with iodometric method. While microbiologically was done with cylinder diffusion method using Antibiotika-1 media.

Result of data analysis and research use regresi test at $\alpha = 0,05$ showing the existence of significant linear relation between *N*-(3,4-dichlorobenzoyl)cephalexin rate by iodometri (variable x) and microbiologically (variable y). This relation is expressed with the equation $y = 0,186 x + 9,335$ ($n = 5$; $r = 0,961$; $F = 35,995$) for the *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Keyword :

N-(3,4-dichlorobenzoyl)cephalexin,
determination the level of active compound,
antibacterial activity

DAFTAR ISI

	halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1 Latar Belakang Masalah	1
2 Rumusan Masalah	5
3 Tujuan Penelitian	6
4 Hipotesis	6
5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
1 Tinjauan Tentang Sefaleksin	7
1.1 Sifat Kimia Fisika Sefaleksin	8
1.2 Stabilitas Sefaleksin	9
1.3 Mekanisme Kerja Sefaleksin	9
2 Tinjauan Tentang <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin	13
3 Penetapan Kadar Senyawa Aktif Secara Kimia	13
3.1 Metode Kolorimetri/Hidroksamin	13
3.2 Metode Iodometri	14
3.3 Metode Kromatografi Lapis Tipis	16
3.4 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	16
3.5 Metode Kromatografi Kertas	16
3.6 Metode Spektrofotometri Ultra Lembayung	16
3.7 Elektroforesis	17

4	Tinjauan Tentang <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4.1	Morfologi	17
4.2	Biakan	17
4.3	Sifat-sifat Pertumbuhan.....	17
4.4	Resistensi	18
5	Penentuan Aktivitas Mikrobiologi	18
5.1	Metode Dilusi.....	19
5.2	Metode Difusi	19
	BAB III KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	22
	BAB IV METODE PENELITIAN	25
1	Rancangan Penelitian	25
1.1	Penetapan Kadar Senyawa Aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil sefaleksin Secara Iodometri	25
1.2	Uji Aktivitas <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dengan Metode Difusi Silinder.....	26
2	Bahan-bahan.....	27
2.1	Bahan-bahan untuk Penetapan Kadar secara Iodometri.....	27
2.2	Bahan-bahan untuk Penentuan Aktivitas secara Mikrobiologi	27
3	Alat-alat.....	27
4	Cara Pelaksanaan	28
4.1	Pemeriksaan Kualitatif Senyawa	28
4.1.1	Pemeriksaan Organoleptis.....	28
4.1.2	Reaksi Warna	28
4.1.3	Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis	28
4.1.4	Pemeriksaan Titik Lebur	28
4.2	Pembuatan Larutan Uji <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin untuk Penetapan Kadar secara Iodometri dan Mikrobiologi	29
4.3	Penetapan Kadar Senyawa Aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin secara Iodometri	29

4.3.1	Pembuatan Larutan Baku Primer Kalium Iodat 0,02 N	29
4.3.2	Pembuatan Larutan Natrium Tiosulfat 0,02 N	29
4.3.3	Pembuatan Larutan Asam Sulfat 2 N	29
4.3.4	Pembuatan Indikator Larutan Amilum	29
4.3.5	Pembakuan Larutan Natrium Tiosulfat dengan Larutan Baku Primer Kalium Iodat	30
4.3.6	Pembuatan Larutan Iodium 0,02 N	30
4.3.7	Pembakuan Larutan Iodium dengan Larutan Natrium Tiosulfat	30
4.3.8	Pembuatan Larutan NaOH 0,5 N	30
4.3.9	Pembuatan Larutan Asam Klorida 0,75 N	30
4.3.10	Pembuatan Larutan Dapar asetat	30
4.3.11	Penetapan Kadar Senyawa Aktif dan Tidak Aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin	31
4.3.12	Penetapan Kadar Senyawa Tidak Aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin	31
4.3.13	Rumus Perhitungan Kadar Senyawa Aktif	31
4.3.14	Replikasi	32
4.4	Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32
4.5	Uji Aktivitas Antibakteri <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	33
4.5.1	Pembuatan Media Antibiotika-1	33
4.5.2	Penyiapan Bakteri Uji	33
4.5.3	Penentuan Aktivitas Antibakteri	33
4.5.4	Replikasi	34
4.6	Analisa Data	34
BAB V	HASIL PENELITIAN	37
1	Hasil Pemeriksaan Kualitatif terhadap <i>N</i> -(diklorobenzoil) sefaleksin	36
2	Hasil Pemeriksaan KLT	36
3	Hasil Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 92523	37

4	Hasil Penetapan Kadar Senyawa Aktif <i>N</i> -(diklorobenzoil) sefaleksin secara Iodometri	37
5	Hasil Penentuan Diameter Daerah Hambatan terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	41
6	Hubungan antara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif <i>N</i> -(diklorobenzoil)sefaleksin yang Ditetapkan secara Iodometri dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	42
BAB VI	PEMBAHASAN	44
BAB VII	KESIMPULAN DAN SARAN	49
BAB VIII	DAFTAR PUSTAKA	50

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel V.1 Hasil pemeriksaan kualitatif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin.....	36
Tabel V.2 Hasil KLT senyawa <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin pada berbagai fase gerak.....	37
Tabel V.3 Hasil penetapan kadar larutan uji <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin pada suhu kamar (30 °C).....	38
Tabel V.4 Hasil penetapan kadar larutan uji <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 50 °C.....	38
Tabel V.5 Hasil penetapan kadar larutan uji <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 60 °C.....	39
Tabel V.6 Hasil penetapan kadar larutan uji <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 70 °C.....	39
Tabel V.7 Hasil penetapan kadar larutan uji <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 80 °C.....	40
Tabel V.8 Diameter daerah hambatan larutan uji <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	41
Tabel V.9 Hubungan antara kadar rata-rata senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan diameter daerah hambatan terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	42

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1 Struktur molekul sefaleksin monohidrat	7
Gambar 2.2 Interaksi sefaleksin dengan enzim transpeptidase.....	11
Gambar 2.3 Posisi β -laktamase pada bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif	12
Gambar 2.4 Struktur molekul <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin	13
Gambar 2.5 Reaksi penetapan kadar sefaleksin secara iodometri	15
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian	24
Gambar 4.1 Rancangan penelitian untuk penetapan kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dengan metode iodometri.....	25
Gambar 4.2 Rancangan penelitian uji aktivitas <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin dengan metode difusi silinder	26
Gambar 5.1 Kurva hubungan antara suhu pemanasan ($^{\circ}$ C) dengan kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri.....	40
Gambar 5.2 Kurva persamaan garis regresi antara kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan diameter daerah hambatan terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	43

BAB I

PENDAHULUAN

1 Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan yang cukup penting dan banyak terjadi di masyarakat. Pada zaman dahulu, cara yang digunakan untuk mengatasi atau untuk mengobati penyakit infeksi hanyalah dengan minum ramuan-ramuan yang berasal dari tanaman. Seiring dengan perkembangan zaman dan pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan maka ditemukan cara yang lebih modern dan efektif untuk mengatasi mikroba, penyebab dari timbulnya berbagai penyakit infeksi, yaitu dengan menggunakan antibiotika. Dengan banyaknya penyakit infeksi yang terjadi di masyarakat maka penemuan-penemuan baru dari penelitian yang berkaitan dengan antibiotika, baik secara klinik maupun laboratorik, masih sangat diperlukan (Black, 1999).

Kegiatan penelitian mengenai antibiotika pertama kali dilakukan oleh sarjana Inggris, Alexander Fleming, pada tahun 1928. Antibiotika yang ditemukan pada penelitian tersebut adalah penisilin. Penemuan penisilin ini merupakan titik tolak penelitian yang menghasilkan senyawa dengan sifat anti infeksi yang menakjubkan dan segera mempengaruhi perkembangan penggunaannya. Antibiotika tersebut mempunyai arti penting yang sangat bermakna dalam bidang kedokteran sejak digunakan untuk terapi oleh Florey dan Chain serta rekan-rekannya pada tahun 1941 di Oxford (Black, 1999). Selanjutnya penelitian-penelitian mengenai antibiotika berkembang dengan pesat dan ditemukan antibiotika sefalosporin yang berasal dari *Cephalosporium acremonium* oleh Brotzu pada tahun 1943 (Tjay, 1991; Black, 1999). Pada pertengahan tahun 1960, antibiotika sefalosporin pertama kali digunakan dalam pengobatan (Smith, 1992).

Sefalosporin merupakan salah satu antibiotika β -laktam yang merupakan satu dari beberapa kelompok antibiotika yang penting. Sefalosporin merupakan obat alternatif untuk pengganti turunan penisilin bagi penderita yang tidak tahan (alergi) terhadap penisilin (Gan, 1995). Cincin β -laktam yang dimiliki oleh sefalosporin adalah syarat mutlak untuk khasiatnya. Jika cincin ini terbuka oleh enzim β -laktamase (penisilinase atau sefalosporinase) maka aktivitasnya akan

lenyap. Pada umumnya enzim penisilinase hanya dapat meng-inaktifkan penisilin, dan tidak sefalosporin. Dan sebaliknya, enzim sefalosporinase hanya dapat meng-inaktifkan sefalosporin, dan tidak penisilin. Keunggulan sefalosporin dibanding turunan penisilin adalah ketahanan terhadap enzim penisilinase dan spektrum kerja sefalosporin adalah lebih besar dan meliputi banyak kuman Gram-negatif (Black, 1999).

Salah satu antibiotika turunan sefalosporin yang banyak digunakan untuk pengobatan dan telah banyak dikenal oleh masyarakat adalah sefalekssin. Sefalekssin merupakan turunan pertama sefalosporin. Sefalekssin hampir diabsorpsi secara sempurna pada saluran cerna sehingga bisa diberikan secara per oral. Makanan dalam lambung tidak mengganggu absorpsinya tetapi memperlambat tercapainya kadar puncak. Sefalekssin dapat menghambat kuman Gram-positif dan beberapa kuman Gram-negatif. Sefalekssin digunakan terutama untuk pengobatan infeksi saluran kemih karena sedikit diikat oleh protein plasma dan sebagian besar diekskresikan melalui ginjal dalam bentuk tidak berubah (Gan, 1995). Sefalekssin juga digunakan untuk pengobatan infeksi pada sistem kardiovaskular, saluran nafas, kulit dan jaringan lunak (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Agar dapat memberikan efek terapi yang diharapkan maka sefalekssin harus mampu melawan bakteri patogen secara maksimal dengan tidak menimbulkan efek samping (toksisitas) yang besar. Selain itu, sefalekssin juga harus stabil secara kimia, fisika, mikrobiologi, terapeutik dan toksikologi. Dari proses pembuatan hingga pengadaan obat sampai ke tangan masyarakat (konsumen, pasien) memerlukan waktu yang lama. Bahkan penyimpanan di pabrik obat, apotek dan konsumen dapat mencapai tahunan dan bisa mencapai batas kadaluarsanya. Dalam penyimpanan tersebut, sefalekssin dapat mengalami peruraian (degradasi) yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar senyawa aktif sehingga pemberian dosis menjadi tidak tepat. Selanjutnya akan terjadi penurunan efek terapi, atau bahkan efek terapi yang diinginkan tidak tercapai.

Aktivitas sefalekssin sangat dipengaruhi oleh cincin β -laktam, yang dapat terbuka karena pengaruh pH, suhu, dan kelembaban. Kadar sefalekssin yang mempunyai cincin β -laktam utuh inilah yang dinyatakan sebagai persentase kadar sefalekssin yang disyaratkan oleh farmakope, yaitu kadar sefalekssin tidak boleh

kurang dari 95% dari zat anhidrat (Anonim, 1979). Untuk mendapatkan senyawa baru turunan sefaleksin yang memiliki stabilitas dan aktivitas lebih baik, dilakukan sintesis senyawa-senyawa turunan dari sefaleksin. Salah satu senyawa hasil sintesis yang dilakukan oleh Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga adalah senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin. Sintesis dilakukan dengan menambahkan gugus 3,4-diklorobenzoil pada gugus *N*-amino dari sefaleksin (Hardjono, 2002).

Adanya gugus 3,4-diklorobenzoil pada gugus primer struktur sefaleksin, akan meningkatkan sifat lipofilitas dan sifat elektronik senyawa sehingga akan mempengaruhi distribusi dan proses interaksi senyawa dengan reseptor. Peningkatan sifat lipofilitas akan meningkatkan penembusan senyawa ke dalam membran biologis sehingga jumlah senyawa yang berinteraksi dengan reseptor menjadi besar. Sedangkan peningkatan sifat elektronik akan mempengaruhi ikatan senyawa dengan reseptor.

Adanya sifat lipofilitas yang lebih tinggi akan mempermudah penembusan membran bakteri secara difusi pasif dari senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin. Sehingga diharapkan aktivitas terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif akan meningkat. Selain itu adanya gugus/substituen yang bersifat elektronegatif yaitu gugus kloro (Cl) dalam *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin akan meningkatkan sifat elektronik senyawa tersebut sehingga ikatan senyawa dengan reseptor semakin kuat (Hardjono, 2002).

Kadar *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang mempunyai cincin β -laktam utuhlah dinyatakan sebagai persentase kadar yang disyaratkan dalam farmakope. Berbagai kondisi yang dialami selama proses pembuatan sediaan, penyimpanan, dan transportasi dapat menyebabkan terjadinya pemutusan cincin β -laktam akibat adanya pengaruh pH, suhu, asam kuat, basa kuat, sinar UV, atau β -laktamase yang dihasilkan oleh bakteri tertentu (Lund, 1994). Pemutusan cincin β -laktam menyebabkan terjadinya penurunan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin sehingga pemberian dosis menjadi tidak tepat.

Sebagai turunan dari sefaleksin, aktivitas *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin ditentukan oleh bentuk utuh dari struktur inti β -laktam karena hanya dalam bentuk utuh cincin β -laktam akan menghasilkan aktivitas sebagai antibakteri. Cincin β -

laktam yang dimiliki adalah syarat mutlak untuk khasiatnya. Jika cincin ini terbuka maka aktivitasnya akan hilang. Penurunan jumlah cincin β -laktam utuh akan menyebabkan penurunan efek terapi yaitu aktivitas antibakteri, atau bahkan efek terapi yang diinginkan tidak tercapai.

Untuk melihat perubahan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dapat dilakukan penetapan kadar secara kimia. Dan untuk mengetahui perubahan aktivitas antibakterinya dapat dilakukan uji aktivitas antimikroba (penetapan kadar secara mikrobiologi).

Metode penetapan kadar secara kimia antara lain spektrofotometri, titrasi (iodometri), kromatografi lapis tipis, kromatografi cair kinerja tinggi, kromatografi kertas, elektroforesis dan kolorimetri (Anonim, 1979; Anonim, 1990; Florey, 1975). Penetapan secara kimia untuk mengetahui jumlah senyawa aktif yang masih utuh (cincin β -laktam belum terbuka). Penetapan kadar secara kimia memiliki kelebihan yaitu hasil lebih teliti, lebih praktis dan lebih cepat karena variabel yang mempengaruhi hasil lebih sedikit.

Metode penetapan kadar yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode titrasi (iodometri), karena metode ini merupakan metode yang paling sederhana dan mudah untuk dilakukan. Prinsip dasar metode ini adalah molekul *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang utuh (cincin β -laktam utuh) tidak bereaksi dengan iodium tetapi iodium tersebut bereaksi dengan hasil hidrolisis suasana alkali dari *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin (cincin β -laktam putus). Variasi waktu hidrolisis, temperatur, dan pH larutan mempengaruhi jumlah iodium yang bereaksi (Yamana & Tsuji, 1976). Dalam penelitian ini untuk mendapatkan kadar senyawa aktif yang bervariasi dilakukan pemanasan senyawa pada suhu 50°C, 60°C, 70°C, dan 80°C serta dilakukan pengamatan pada suhu kamar (30°C).

Untuk mengetahui apakah penetapan kadar secara iodometri mencerminkan kadar senyawa aktif secara biologi, maka penelitian dilanjutkan dengan uji mikrobiologi atau penentuan potensi antibakterinya.

Uji aktivitas antibakteri secara mikrobiologi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode difusi silinder. Metode ini didasarkan pada difusi antibiotika dari pencadang (silinder) yang dipasang tegak lurus pada bagian lapisan agar padat pada cawan petri sehingga mikroba yang ada dihambat

pertumbuhannya pada daerah berupa lingkaran atau zona bening di sekeliling silinder yang berisi larutan antibiotika. Daerah berupa lingkaran atau zona bening di sekeliling silinder itu disebut daerah hambatan. Metode difusi silinder ini lebih mudah dilaksanakan dan memerlukan waktu yang relatif lebih singkat dibanding dengan metode turbidimetri (metode dilusi) (Anonim, 1979). Hasil penentuan diameter daerah hambatan inilah yang akan menjadi dasar penelitian ini dalam mencari hubungannya dengan kadar antibiotika hasil analisa secara kuantitatif secara kimia.

Uji aktivitas antibakteri secara mikrobiologi diperlukan untuk mengetahui seberapa besar potensi yang dimiliki oleh senyawa aktif dalam melawan mikroorganisme. Aktivitas tersebut tergantung pada keutuhan cincin β -laktam (Anonim, 1990). Secara mikrobiologi dapat pula ditunjukkan aktivitas antibiotika yang sesuai dengan efek daya hambatnya terhadap mikroba. Sedikit penurunan daya antimikroba akan menunjukkan perubahan yang tidak dapat ditunjukkan dengan metode kimia, sehingga pengujian secara mikrobiologi masih merupakan standar untuk mengatasi keraguan tentang kemungkinan hilangnya aktivitas (Anonim, 1995).

Kuman yang digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus*. Kuman tersebut dipilih karena sesuai dengan sifatnya yang peka terhadap sefaleksin, yang merupakan persyaratan kuman untuk uji mikrobiologis. Selain itu *Staphylococcus aureus* merupakan kuman yang sering digunakan dalam penelitian sebagai wakil dari bakteri Gram-positif.

Pada penelitian ini diharapkan akan terlihat adanya hubungan antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dengan diameter daerah hambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, permasalahan yang timbul adalah : Apakah ada hubungan yang linier antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dan menjelaskan adanya hubungan yang linier antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah : Ada hubungan yang linier antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapat dari penelitian ini, setelah diperoleh hubungan yang linier antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, diharapkan : Penetapan kadar secara reaksi kimia dengan menggunakan metode iodometri dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin.

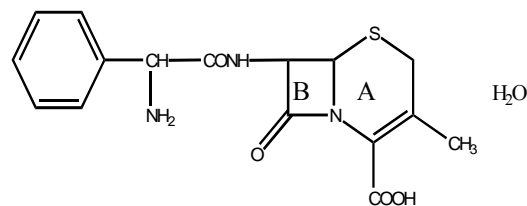
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1 Tinjauan Tentang Sefaleksin

Struktur molekul sefalosporin terdiri dari cincin β -laktam yang bersatu dengan cincin dihidrothiazin, dimana variasi yang didapatkan dari kelompok sefalosporin lebih banyak karena C-3 dari cincin dihidrothiazin maupun C-7 dari cincin β -laktam dapat disubstitusi. Substitusi pada 7-asil penting untuk pengendalian resistensi terhadap β -laktamase, aktivitas antibakteri dan berperan pada kemampuan absorpsi setelah pemberian per oral. Sedangkan substitusi pada C-3 meskipun tidak berpengaruh pada aktivitasnya, namun memiliki pengaruh pada jangka waktu senyawa berada dalam tubuh dan pada saat absorpsi oral.

Sefaleksin merupakan senyawa semi sintetik dari generasi pertama sefalosporin. Sefaleksin memiliki gugus 7-asil yang secara struktur berdekatan, yaitu mempunyai substituen amina pada C- α dan cincin siklik enam karbon, gugus amina yang penting untuk sifat absorpsi setelah pemberian oral, serta gugus metil pada posisi C-3 yang optimum untuk absorpsi meskipun memiliki aktivitas yang kurang (Wattimena, *et al.*, 1991).



A = cincin dihidrothiazin

B = cincin β -laktam

Gambar 2.1 Struktur molekul sefaleksin monohidrat
(Anonim, 1979)

Nama kimia sefaleksin monohidrat yaitu :

7- α -(D-amino- α -phenylacetamido)-3-methyl cephem carboxylic acid monohydrat
(Martin, 1982)

Dengan rumus molekul $C_{16}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$ dan berat molekul 365,40 untuk sefaleksin monohidrat. Dan bentuk anhidratnya memiliki rumus molekul $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ dan berat molekul 347,40 (Anonim, 1995).

Sefaleksin dapat diberikan secara per oral karena mengandung gugus α -amino yang menyebabkan senyawa tahan terhadap asam lambung. Makanan dalam lambung tidak mengganggu absorpsinya tetapi memperlambat tercapainya kadar puncak. Sefaleksin dapat menghambat kuman Gram-positif dan beberapa kuman Gram-negatif. Sefaleksin digunakan terutama untuk pengobatan infeksi saluran kemih karena sedikit diikat oleh protein plasma dan sebagian besar diekskresikan melalui ginjal dalam bentuk tak berubah (90%) (Gan, 1995). Sefaleksin juga digunakan untuk pengobatan infeksi pada sistem kardiovaskuler, saluran napas, kulit dan jaringan lunak. Sefaleksin aktif terhadap bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* dan *Pneumococcus sp.*, dan Gram negatif seperti *Eschericia coli*, *N. Gonorrhoea*, *K. Pneumonia*, *P. Mirabilis* dan *H. influenzae* (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

1.1 Sifat Kimia Fisika Sefaleksin

Sefaleksin merupakan serbuk hablur dengan warna putih sampai putih kuning gading dan memiliki bau yang khas. Berdasarkan data kelarutan, sefaleksin larut dalam 100 bagian air, dalam 30 bagian larutan asam klorida 0,2%; praktis tidak larut dalam etanol (95%), dalam kloroform P dan dalam eter P (Anonim, 1979). Larutan 0,5% (w/v) dalam air mempunyai pH 4,0-5,5 dan suspensi 5% sefaleksin dalam air mempunyai pH 3,0-5,5 (Lund, 1994).

Sefaleksin dikenal dalam bentuk sefaleksin anhidrat, monohidrat, dihidrat, bentuk garam natrium dan garam lisinat. Di beberapa negara, bentuk garam natrium dan garam lisinat banyak digunakan sebagai preparat parenteral (Reynold, 1982).

Menurut Pfeiffer *et al.*, sefaleksin dalam larutan air akan mengkristal pada suhu kamar sebagai dihidrat namun akan segera berubah menjadi bentuk monohidrat apabila kelembaban relatif kurang dari 70% (Lund, 1994). Penyimpanan dilakukan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya dan pada suhu tidak lebih dari 30°C (Anonim, 1979).

1.2 Stabilitas Sefaleksin

Aktivitas biologik dari sefaleksin berhubungan dengan reaktivitas dari ikatan C-N pada cincin β -laktam. Adanya ketidakstabilan cincin β -laktam ini menyebabkan hilangnya aktivitas anti bakteri. Sefaleksin yang merupakan derivat semisintetik dari sefalosporin, stabilitasnya tergantung pada pH, suhu, asam kuat, basa kuat, sinar ultraviolet (260 nm), dan β -laktamase (sefalosporinase) yang dihasilkan oleh beberapa jenis bakteri tertentu (Lund, 1994). Dalam bentuk larutan dan suspensi, sefaleksin terdegradasi dengan sangat cepat pada media yang bersifat netral dan basa. Pada media yang bersifat asam sefaleksin berada dalam keadaan yang lebih stabil selama beberapa hari bila disertai dengan penyimpanan pada tempat dingin (lemari es). Stabilitas sefaleksin paling optimal pada pH 4,5 (Lund, 1994).

Pada suhu 25°C, pada rentang pH 3,0-5,0 tidak terjadi kehilangan aktivitas selama 72 jam namun pada pH 6,0 dan 7,0 kecepatan peruraian menjadi 3% dan 18% per hari. Pada penyimpanan dalam lemari es tidak terjadi kehilangan aktivitas yang berarti selama jangka waktu 72 jam meskipun pada pH 3,0-7,0. Pada suhu 37°C, dalam dapar asam klorida (pH 1,2) sefaleksin kehilangan aktivitas sebanyak 5% dalam 24 jam dan dalam dapar fosfat (pH 6,5) sefaleksin kehilangan aktivitas sebanyak 45% dalam 24 jam (Lund, 1994).

Beberapa organisme penghasil enzim β -laktamase atau sefalosporinase dapat mempercepat terjadinya degradasi sefaleksin. Degradasi ini terjadi melalui pembukaan cincin β -laktam. Adanya interaksi β -laktam dengan enzim β -laktamase atau sefalosporinase menyebabkan sefaleksin tidak dapat berinteraksi dengan enzim transpeptidase dari mikroorganisme (Smith, 1992).

1.3 Mekanisme Kerja Sefaleksin

Sefaleksin merupakan senyawa kimia golongan antibiotika β -laktam. Sebagai salah satu derivat golongan antibiotika β -laktam, cara kerja sefaleksin pun sama dengan golongan antibiotika β -laktam secara umum yaitu dengan menghambat biosintesis dinding sel kuman yang sedang berkembang.

Dinding sel bakteri adalah struktur yang kompleks dan berfungsi terutama sebagai selubung untuk melindungi protoplasma dan memberikan bentuk

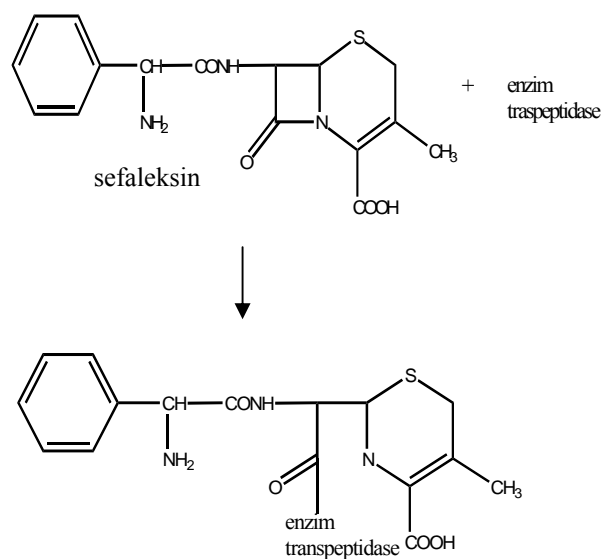
karakteristik bakteri. Peptidoglikan merupakan makromolekul penting untuk kehidupan bakteri yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Peptidoglikan mempunyai peran penting dalam memelihara keutuhan dinding dan bentuk sel karena mempunyai kisi-kisi struktur melintang dan berhubungan sangat erat. Dinding sel bakteri Gram positif mengandung 50-100 lapisan peptidoglikan, sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif hanya terdiri dari 1-2 lapisan. Penghambatan pembentukan peptidoglikan menyebabkan hilangnya kekuatan dan kekakuan dinding sel sehingga sel mengalami kematian.

Kekuatan dan kekakuan peptidoglikan disebabkan oleh rangka dasar struktur, ditulangpunggung oleh rantai oligosakarida yang dihubungkan bersamasama melalui rantai cabang peptida pendek. Peptidoglikan merupakan molekul polimer dari rantai-rantai polisakarida yang diikat dengan ikatan silang peptida. Tiap monomer terdiri atas N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat.

Fungsi dinding bakteri yaitu untuk melindungi protoplasma. Strukturnya sangat kompleks dengan rangka dasar yang terdiri dari polisakarida kristalin, kitin dan β -glukan, dan suatu matriks yang terdiri dari polisakarida amorf dan kompleks protein-sakarida. Kitin dan β -glukan bertanggungjawab terhadap kekuatan mekanis dinding sel bakteri.

Kemiripan antara bagian struktur sefaleksin dengan bagian tertentu dari asam N-asetil muramat, D-alanil-D-alanin dan L-alanin-D-asam glutamat sering digunakan untuk menjelaskan mekanisme kerja sefaleksin.

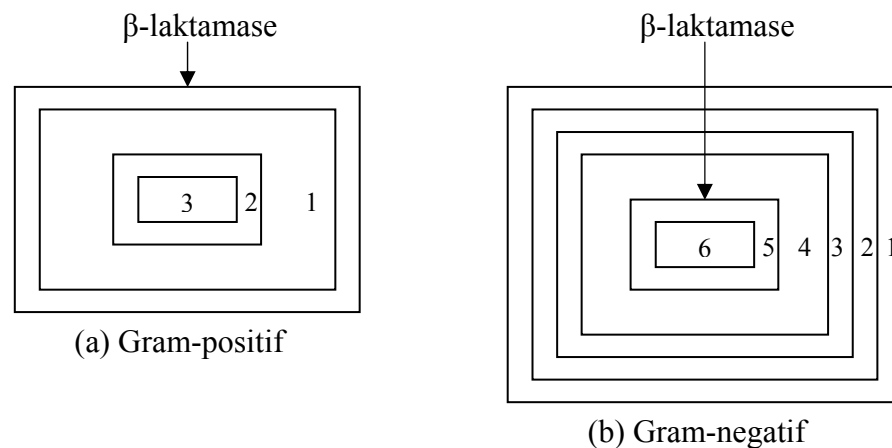
Tahap akhir sintesis dinding sel bakteri adalah reaksi hubungan melintang (*cross linking*) antar unit-unit peptidoglikan dengan katalisator enzim transpeptidase. Karena sefaleksin mempunyai struktur yang mirip dengan gugus ujung D-alanil-D-alanin dari bagian pentapeptida unit peptidoglikan, maka sefaleksin dapat menghambat kerja enzim transpeptidase dengan mengikat enzim melalui ikatan kovalen sehingga mencegah pembentukan dinding sel bakteri (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Interaksi sefaleksin dengan enzim transpeptidase dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Interaksi sefaleksin dengan enzim transpeptidase (Siswandono dan Soekardjo, 1995)

Sefaleksin hanya dapat membunuh bakteri pada fasa pertumbuhan dan tidak dapat mempengaruhi bakteri yang dalam bentuk tidak aktif atau persisten. Karena sel mamalia tidak mempunyai dinding sel, maka sefaleksin tidak akan mempengaruhi sel mamalia. Sefaleksin (antibiotika β -laktam) dan antibiotika lain yang menghambat biosintesis dinding sel bakteri bersifat sangat khas dan mempunyai toksisitas yang selektif terhadap bakteri.

β -laktamase adalah enzim yang dapat menginaktifkan antibiotika β -laktam, termasuk sefaleksin. β -laktamase merupakan mekanisme pertahanan bakteri terhadap antibiotika turunan β -laktam. Keberadaan β -laktamase pada bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif berbeda. Perbedaan posisi enzim β -laktamase pada bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Posisi β -laktamase pada bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif.
gambar (a) 1. Peptidoglikan, 2. membran sel, 3. sitoplasma,
gambar (b) 1. Amplop terluar, 2. peptidoglikan, 3. membran terluar, 4. ruang periplasma, 5. membran terdalam, 6. sitoplasma.
(Siswandono dan Soekardjo, 1995)

Pada bakteri Gram-negatif, enzim β -laktamase terdapat pada ruang periplasma, suatu posisi yang strategis karena harus dilewati oleh antibiotika β -laktam sebelum mencapai sasaran. Pada bakteri Gram-positif, enzim tersebut dilepaskan ke dalam medium dan merusak antibiotika β -laktam sebelum mencapai sel. Meskipun demikian, sefaleksin sebagai derivat turunan pertama sefalosporin, memiliki sifat yang tahan terhadap β -laktamase luar sel yang dihasilkan oleh bakteri Gram-positif namun tidak tahan terhadap β -laktamase yang dihasilkan oleh bakteri Gram-negatif. Hal inilah yang menyebabkan sefaleksin lebih efektif terhadap bakteri Gram-positif (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Untuk menunjukkan kerja pada bakteri Gram-negatif seperti *Eschericia coli* atau *Pseudomonas aeruginosa*, sefalosporin (sefaleksin) pertama-tama harus menembus membran terluar selubung bakteri secara difusi pasif melalui saluran yang terbentuk oleh pori protein (yang disebut dengan istilah porin). Sesudah menembus membran terluar, antibiotika masuk melalui dinding sel, melewati ruang periplasma dan mencapai sasaran yaitu enzim serin protease yang terdapat pada membran terdalam (sitoplasma). Enzim inilah yang bertanggungjawab

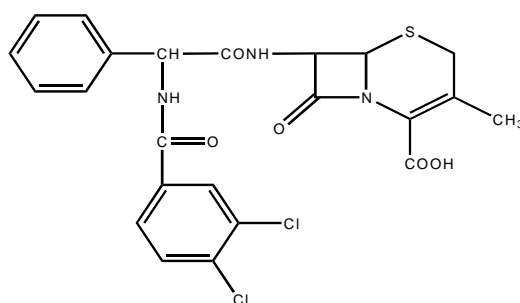
terhadap biosintesis dinding sel. Pengaruh pada biosintesis dinding sel merupakan kerja bakterisid utama dari sefaleksin.

Efek sefaleksin terhadap bakteri adalah :

- (1) Menghentikan pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat sintesis peptidoglikan
- (2) Menurunkan kelangsungan hidup kultur
- (3) Membuat sel menjadi lisis

2 Tinjauan Tentang *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin

N-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin memiliki bentuk amorf seperti kapas, warna putih tulang dan memiliki bau yang khas. *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin larut dalam metanol, aseton, kloroform dan dimetilsulfoksida (DMSO) (Hardjono, 2002). Dengan rumus molekul $C_{23}H_{19}N_3O_5SCl_2$ dan berat molekul 520,39. Rumus struktur senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 2.4 Struktur molekul *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin (Hardjono, 2002)

3 Penentuan Kadar Senyawa Aktif secara Kimia

3.1 Metode Kolorimetri/Hidroksamin

Dasar reaksi metode ini adalah bahwa hidrosilamin memutuskan cincin β -laktam (pH 7,0) untuk membentuk hidrosamat yang akan berikatan dengan ion ferri membentuk kompleks berwarna. Warna yang terjadi diukur dengan alat Auto Analyzer pada panjang gelombang 510 nm. Metode ini dapat digunakan untuk mengukur kadar antibiotika yang mempunyai struktur β -laktam (Florey, 1975; Higuchi, 1969).

3.2 Metode Iodometri

Prinsip metode ini bahwa molekul sefaleksin yang utuh (cincin β -laktam utuh) tidak bereaksi dengan iodium tetapi iodium tersebut bereaksi dengan hasil hidrolisis alkali dari sefaleksin (cincin β -laktam putus). Hidrolisis alkali menyebabkan pemutusan cincin β -laktam. Variasi waktu hidrolisis, temperatur, dan pH larutan mempengaruhi jumlah iodium yang bereaksi (Yamana dan Tsuji, 1976).

Berdasarkan Farmakope Indonesia edisi III, metode terpilih untuk penetapan kadar senyawa aktif sefaleksin secara kimia adalah metode iodometri. Pada metode ini sefaleksin dihidrolisis dengan penambahan larutan natrium hidroksida (NaOH) dan didiamkan selama 20 menit. Kemudian ditambahkan ke dalamnya suatu larutan dapar asetat dan diasamkan dengan larutan asam klorida (HCl). Selanjutnya ditambahkan ke dalamnya larutan iodium dan didiamkan selama 20 menit. Kelebihan iodium yang terjadi dititrasi dengan larutan tiosulfat standar.

Sebagai blanko digunakan sefaleksin yang langsung ditambah larutan dapar dan iodium. Kelebihan iodium dititrasi dengan larutan tiosulfat standar. Perbedaan kedua hasil titrasi menunjukkan volume iodium yang setara dengan kadar senyawa aktif sefaleksin. Indikator yang digunakan yaitu larutan kanji dan titik akhir titrasi ditandai dengan tepat hilangnya warna biru dari larutan (Anonim, 1979).

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

(1) Pengaruh oksidasi udara (O_2)

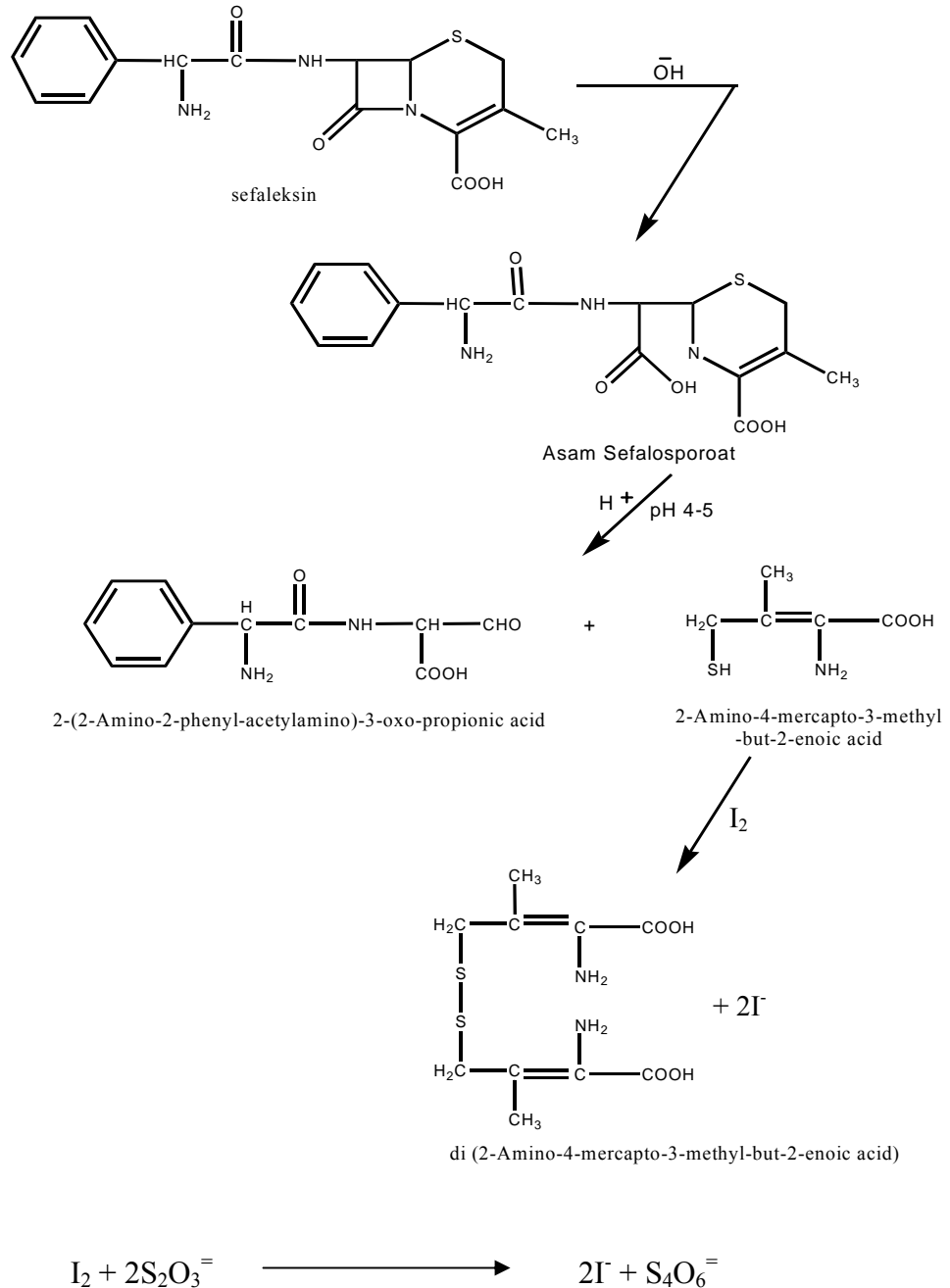
Iodium dalam suasana asam secara perlahan teroksidasi oleh oksigen. Kecepatannya bertambah dengan bertambahnya konsentrasi ion hidrogen dan bertambah besar jika terkena cahaya matahari langsung dan karena adanya senyawa-senyawa yang bersifat katalitik misalnya ion Cu (Kolthoff, 1952).

(2) Pengaruh penguapan iodium

Iodium dalam larutan mudah menguap dengan naiknya temperatur. Penguapan iodium dapat diabaikan jika titrasi dilakukan pada temperatur kamar dan dengan penambahan kalium iodida sebanyak 4%, disimpan

dalam wadah tertutup rapat yang mampu mengurangi pengaruh cahaya (Kolthoff, 1952).

Dengan menganalogkan reaksi penetapan kadar secara iodometri pada sefaleksin dengan penisilin maka reaksi penetapan kadar senyawa aktif pada sefaleksin yaitu :



Gambar 2.5 Reaksi penetapan kadar sefaleksin secara iodometri

3.3 Metode Kromatografi Lapis Tipis

Metode ini menggunakan fase diam silika gel, selulose, kertas kromatogram dan sebagai fase gerak digunakan campuran pelarut organik dengan berbagai perbandingan tertentu. Penampak noda yang dipakai yaitu sinar ultraviolet, ninhidrin, iodoplatina, alkali permanganat dan asam phosphomolibdat (Florey, 1975; Yamana dan Tsuji, 1976).

3.4 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Metode ini digunakan untuk mempelajari kinetika degradasi sefalosporin. Untuk sefaleksin digunakan resin penukar ion sebagai fase diam dan larutan natrium difosfat 0,02 N, yang diatur pH-nya sampai 8,5 dengan natrium hidroksida, sebagai fase gerak. Dengan menggunakan UV detektor pada panjang gelombang 254 nm, dan kolom 2 mm. Elusi sampel 100 kg/cm² pada suhu kamar dengan konsentrasi $5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M. Puncak yang muncul dalam hasil kromatogramnya dibandingkan dengan kurva kalibrasi kemudian dihitung konsentrasinya (Yamana dan Tsuji, 1976).

3.5 Metode Kromatografi Kertas

Metode ini menggunakan fase diam kertas Whatman no. 1, dan menggunakan fase gerak yang merupakan sistem pelarut campur antara butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1). Penampak noda yang digunakan adalah sinar ultraviolet atau larutan ninhidrin (Florey, 1975).

3.6 Metode Spektrofotometri Ultra Lembayung

Sefaleksin dalam larutan air memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 262 nm. Hal ini karena sefaleksin mempunyai gugus kromofor (O=CNC=C-). Jika cincin β -laktam terbuka baik secara kimia maupun secara enzimatik, maka serapan pada panjang gelombang 262 nm tidak dijumpai (Yamana dan Tsuji, 1976).

3.7 Elektroforesis

Metode ini digunakan untuk mengetahui adanya pengotor dalam sefaleksin. Prosedurnya berdasarkan interaksi 7-aminodesacetoxycephalosporinic (7-ADCA) dengan ninhidrin di bawah kondisi kontrol untuk menghasilkan gugus kromofor yang spesifik (Florey, 1975).

4 Tinjauan Tentang *Staphylococcus aureus*

4.1 Morfologi

Staphylococcus aureus termasuk golongan bakteri Gram positif. Selnya berbentuk bola dengan diameter sekitar 1 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur. Pada biakan cair terlihat bentukan seperti anggur, tetrad atau berbentuk rantai, tetapi ada juga yang tunggal dan berpasangan. Golongan stafilocoki ini tidak menghasilkan spora dan tidak bergerak. Di samping itu juga tidak diselubungi kapsul. Bentuk yang tidak teratur terlihat dalam kultur yang ditanam pada media padat. Pada media padat koloninya membentuk bentukan bulat, halus, menonjol dan mengkilap dengan warna abu-abu sampai kuning keemasan. Kokus muda bersifat Gram positif kuat. Pada biakan tua banyak sel menjadi Gram negatif (Jawetz, *et al.*, 1991).

4.2 Biakan

Staphylococcus aureus mudah tumbuh pada berbagai media perbenihan mikroba, baik aerob maupun mikroaerobik. *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi karbohidrat dan menghasilkan pigmen dengan warna yang bervariasi dari putih hingga kuning tua. Selain itu jenis ini dapat memproduksi lipase dan esterase.

Pertumbuhan paling cepat terjadi pada temperatur 37°C, tetapi pembentukan pigmen paling baik pada suhu 25°C. Dalam lempeng agar darah koloni menjadi besar dan menunjukkan daerah hemolisis (Jawetz, *et al.*, 1991).

4.3 Sifat-sifat Pertumbuhan

Stafilocoki ini dapat memproduksi katalase. Hal ini membedakan golongan stafilocoki dengan golongan streptokoki. *Staphylococcus aureus* dapat

memfermentasi karbohidrat secara lambat menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas, baik di bawah kondisi aerob maupun anaerob. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi tetapi enzim katalase dihasilkan secara tetap, sehingga reaksi koagulasinya positif (Jawetz, *et al.*, 1991).

4.4 Resistensi

Staphylococcus aureus relatif tahan terhadap pengeringan, panas (50°C selama 30 menit) dan tahan terhadap natrium klorida (9% NaCl) tetapi dihambat oleh heksaklorofen (3% heksaklorofen).

Resistensi kuman *Staphylococcus aureus* terhadap turunan penisilin disebabkan oleh enzim penisilinase. Enzim ini mampu mengkatalisir pembukaan cincin β -laktam sehingga menghasilkan asam penisilat yang tidak aktif. Produk β -laktamase pada bakteri Gram positif termasuk *Staphylococcus aureus* akan diekskresikan secara ekstraseluler. Pada bakteri Gram negatif, produk β -laktamase akan diekskresi pada ruang periplasmik. Ruang periplasmik adalah ruang antara peptidoglikan yang mengelilingi sitoplasma dengan membran luar yang sangat hidrofobik. Letak β -laktamase ini akan lebih melindungi bakteri Gram negatif (Jawetz, *et al.*, 1991).

5 Penentuan Aktivitas Mikrobiologi

Penentuan kadar secara mikrobiologi mempunyai keunggulan dalam hal lebih peka dan mampu meniadakan hasil pada bentuk senyawa inaktif hasil peruraian (Pelezar, 1986). Selain itu adanya penurunan aktivitas anti mikroba tidak dapat ditunjukkan oleh metode kimia (Anonim, 1995).

Uji aktivitas antibiotika dilakukan berdasarkan kemampuan membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme hidup. Keberhasilan uji aktivitas tidak hanya ditentukan oleh macam antibiotika, tetapi juga sangat ditentukan oleh spesifikasi kuman. Kuman yang resisten terhadap antibiotika akan menimbulkan kesalahan hasil penentuan aktivitas antibiotika (Pelezar, 1986). Oleh karena itu kuman yang digunakan dalam uji aktivitas mikrobiologis harus kuman yang sensitif terhadap antibiotika yang hendak diuji.

Metode yang dapat digunakan dalam penentuan aktivitas mikrobiologi, yaitu metode dilusi dan metode difusi.

5.1 Metode dilusi

Prinsip metode dilusi adalah suatu seri pengenceran larutan antibiotika dalam media pertumbuhan dimulai dari konsentrasi tinggi sampai konsentrasi rendah. Kuman dalam jumlah tertentu ditanam dalam media. Setelah inkubasi akan terlihat hambatan pertumbuhan. Metode dilusi ini dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi hambat minimum atau konsentrasi bakterisidal minimum (Lim, 1998). Berdasarkan media yang digunakan, metode dilusi dapat dibedakan menjadi :

(1) Metode Dilusi Cair

Suatu seri tabung berisi media cair masing-masing mengandung antibiotika dengan konsentrasi yang berbeda. Isolat kuman diinokulasi ke dalam tiap tabung dan dikontrol dengan cepat. Setelah inkubasi, hambatan pertumbuhan dapat dilihat dengan melihat kekeruhan yang terjadi pada masing-masing tabung. Konsentrasi hambat minimum dapat dilihat pada konsentrasi dengan pengenceran tertinggi, yang menunjukkan hasil yang tetap jernih (Lim, 1998).

(2) Metode Dilusi Padat

Suatu seri lempeng berisi agar, masing-masing mengandung antibiotika dengan konsentrasi yang berbeda. Isolat kuman kemudian ditanam dalam lempeng agar tersebut. Setelah inkubasi akan terlihat kadar hambat minimum (Lim, 1998).

Keuntungan dari metode dilusi ini adalah dianggap sangat cocok dan akurat untuk menentukan kadar hambat minimum dari antibiotik. Kerugiannya adalah mahal, memerlukan waktu yang lama. Metode ini sangat jarang digunakan untuk tes kepekaan di laboratorium rumah sakit (Lim, 1998).

5.2 Metode Difusi

Metode difusi ini didasarkan pada difusi antibiotika dari dalam pencadangan ke dalam media yang ditanami kuman uji. Setelah inkubasi akan tampak daerah

jernih disekeliling pencadang dan daerah keruh mengelilingi daerah jernih tersebut. Daerah jernih menunjukkan daerah dimana terjadi hambatan pertumbuhan kuman. Diameter daerah jernih di sekeliling pencadang ini dikenal dengan diameter daerah hambatan. Diameter daerah hambatan sebanding dengan konsentrasi antibiotika dalam pencadang. Makin besar konsentrasi antibiotika dalam pencadang maka makin besar pula diameter daerah hambatan yang terjadi. Dan demikian pula sebaliknya (Jawetz, *et al.*, 1991).

Beberapa faktor yang mempengaruhi diameter daerah hambatan adalah (Jawetz, *et al.*, 1991) :

- (1) Komposisi dan pH kandungan media
- (2) Ketebalan media dalam lempeng
- (3) Temperatur dan waktu inkubasi
- (4) Ukuran inokulum
- (5) Laju difusi antibiotika melawan laju pertumbuhan kuman

Berdasarkan pencadang yang digunakan, metode difusi dapat dibedakan menjadi (Jawetz, *et al.*, 1991; Lim, 1998) :

- (1) Metode Difusi Cakram

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

- (2) Metode Difusi Silinder

Sebagai pencadang dapat digunakan silinder logam atau gelas yang berisi larutan antibiotika dengan kadar tertentu. Jumlah larutan antibiotika dapat diatur sehingga menjamin tersedianya antibiotika dalam pencadang selama waktu inkubasi.

- (3) Metode Difusi Cetak Lubang

Pencadang dalam metode difusi cetak lubang adalah lubang dengan diameter 4-6 mm. Lubang yang terbentuk diisi dengan larutan antibiotika dengan kadar tertentu.

Metode terpilih yang digunakan untuk menentukan aktivitas mikrobiologi sefaleksin adalah metode difusi silinder. Metode difusi silinder memiliki keuntungan yaitu penggunaan yang relatif lebih ekonomis, sederhana dan rentang konsentrasi larutan antibiotika lebih luas dibanding metode dilusi dan cukup teliti.

Untuk menumbuhkan dan mengembangbiakkan kuman diperlukan media yang memenuhi persyaratan-persyaratan tertentu antara lain media harus mengandung unsur-unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan kuman, mempunyai tekanan osmose, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan kuman, harus dalam keadaan steril dan tidak ditumbuhi oleh mikroba lain yang tidak diharapkan (Jawetz, *et al.*, 1991).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

Golongan antibiotika yang sering digunakan untuk pengobatan dan penanggulangan penyakit infeksi adalah golongan β -laktam, yaitu turunan penisilin dan sefalosporin. Turunan sefalosporin merupakan antibiotika yang digunakan untuk pengobatan penyakit infeksi apabila turunan penisilin sudah tidak efektif lagi atau kuman sudah resisten terhadap turunan tersebut (Gan, 1995).

Sefaleksin merupakan senyawa semi sintetik dari generasi pertama sefalosporin. Sefaleksin dapat diberikan secara per oral karena mengandung gugus α -amino yang menyebabkan senyawa tahan terhadap asam lambung. Sefaleksin digunakan terutama untuk pengobatan infeksi saluran kemih karena sedikit diikat oleh protein plasma dan sebagian besar diekskresikan melalui ginjal dalam bentuk tak berubah (Gan, 1995).

Selama proses pembuatan sediaan hingga pengadaan obat sampai ke tangan masyarakat (konsumen, pasien) memerlukan waktu yang lama. Bahkan penyimpanan di pabrik obat, apotek dan konsumen dapat mencapai tahunan dan bisa mencapai batas kadaluarsanya. Dalam penyimpanan tersebut, sefaleksin dapat mengalami peruraian (degradasi) yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar senyawa aktif sehingga pemberian dosis menjadi tidak tepat. Selanjutnya akan terjadi penurunan efek terapi, atau bahkan efek terapi yang diinginkan tidak tercapai.

Untuk mendapatkan senyawa turunan baru sefaleksin yang memiliki stabilitas dan aktivitas lebih baik, dilakukan sintesis senyawa-senyawa turunan dari sefaleksin. Salah satu senyawa hasil sintesis yang dilakukan oleh Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga adalah senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin. Sintesis dilakukan dengan menambahkan gugus 3,4-diklorobenzoil pada gugus *N*-amino dari sefaleksin.

Sebagai suatu bahan obat, tidak tertutup kemungkinan bahwa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin juga mengalami keadaan yang sama seperti senyawa

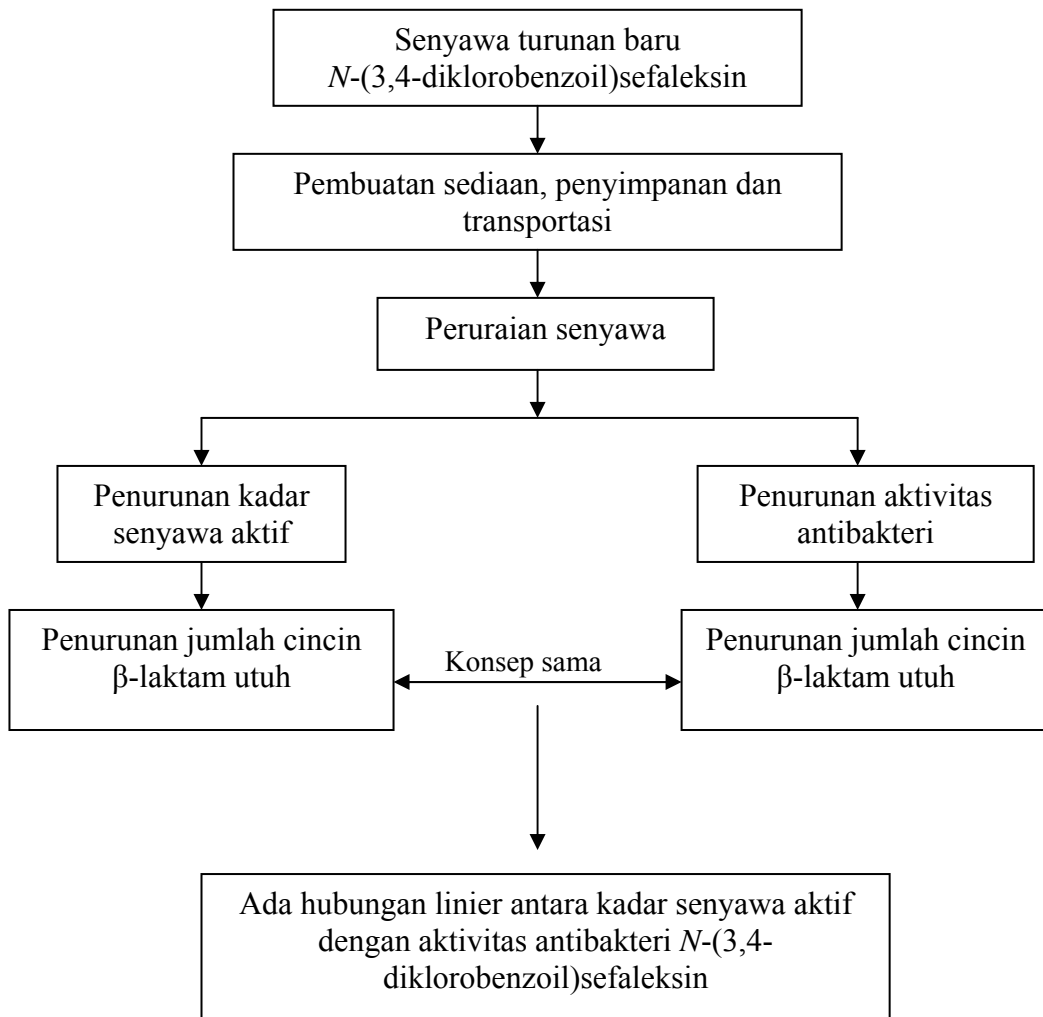
induknya. *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin juga mengalami proses pembuatan menjadi suatu sediaan, penyimpanan maupun transportasi.

Kadar *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang mempunyai cincin β -laktam utuh yang dinyatakan sebagai persentase kadar yang disyaratkan dalam farmakope. Berbagai kondisi yang dialami selama proses pembuatan sediaan, penyimpanan, dan transportasi dapat menyebabkan terjadinya pemutusan cincin β -laktam akibat adanya pengaruh pH, suhu, asam kuat, basa kuat, sinar UV, atau β -laktamase yang dihasilkan oleh bakteri tertentu (Lund, 1994). Pemutusan cincin β -laktam menyebabkan terjadinya penurunan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin sehingga pemberian dosis menjadi tidak tepat.

Sebagai turunan dari sefaleksin, aktivitas *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin ditentukan oleh bentuk utuh dari struktur inti β -laktam karena hanya dalam bentuk utuh cincin β -laktam akan menghasilkan aktivitas sebagai antibakteri. Cincin β -laktam yang dimiliki adalah syarat mutlak untuk khasiatnya. Jika cincin ini terbuka maka aktivitasnya akan hilang. Penurunan jumlah cincin β -laktam utuh akan menyebabkan penurunan efek terapi yaitu aktivitas antibakteri, atau bahkan efek terapi yang diinginkan tidak tercapai.

Ada persamaan konsep antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri yaitu sama-sama berdasarkan jumlah cincin β -laktam utuh, dimana makin banyak cincin β -laktam yang utuh maka makin besar kadar senyawa aktif dan aktivitas antibakteri *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada hubungan yang linier antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri.

Hubungan antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas terhadap bakteri, dapat dihubungkan dalam suatu kurva aktivitas yang menunjukkan kesetaraan hubungan antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin. Secara diagramatis, kerangka konseptual penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.



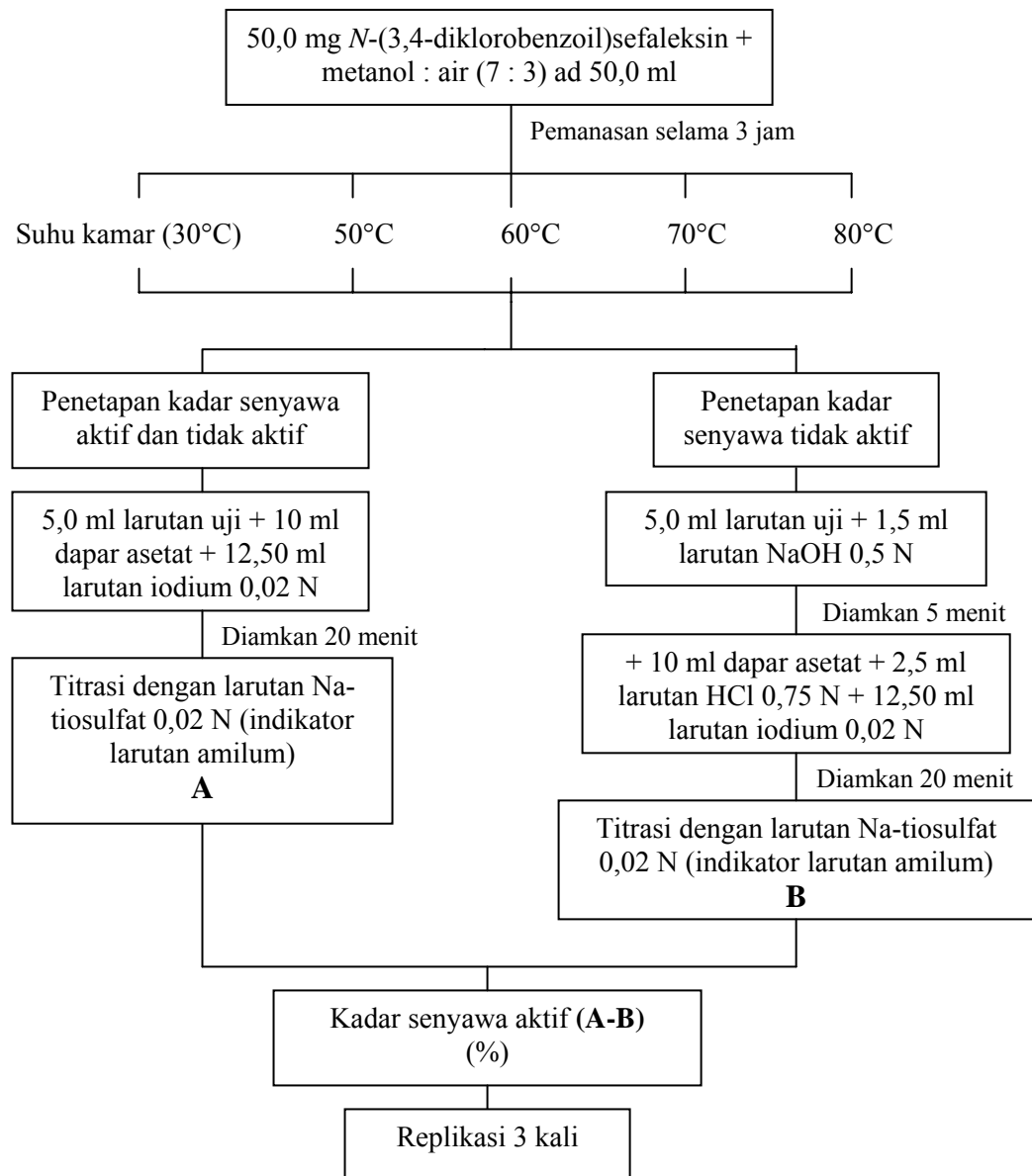
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

BAB IV

METODE PENELITIAN

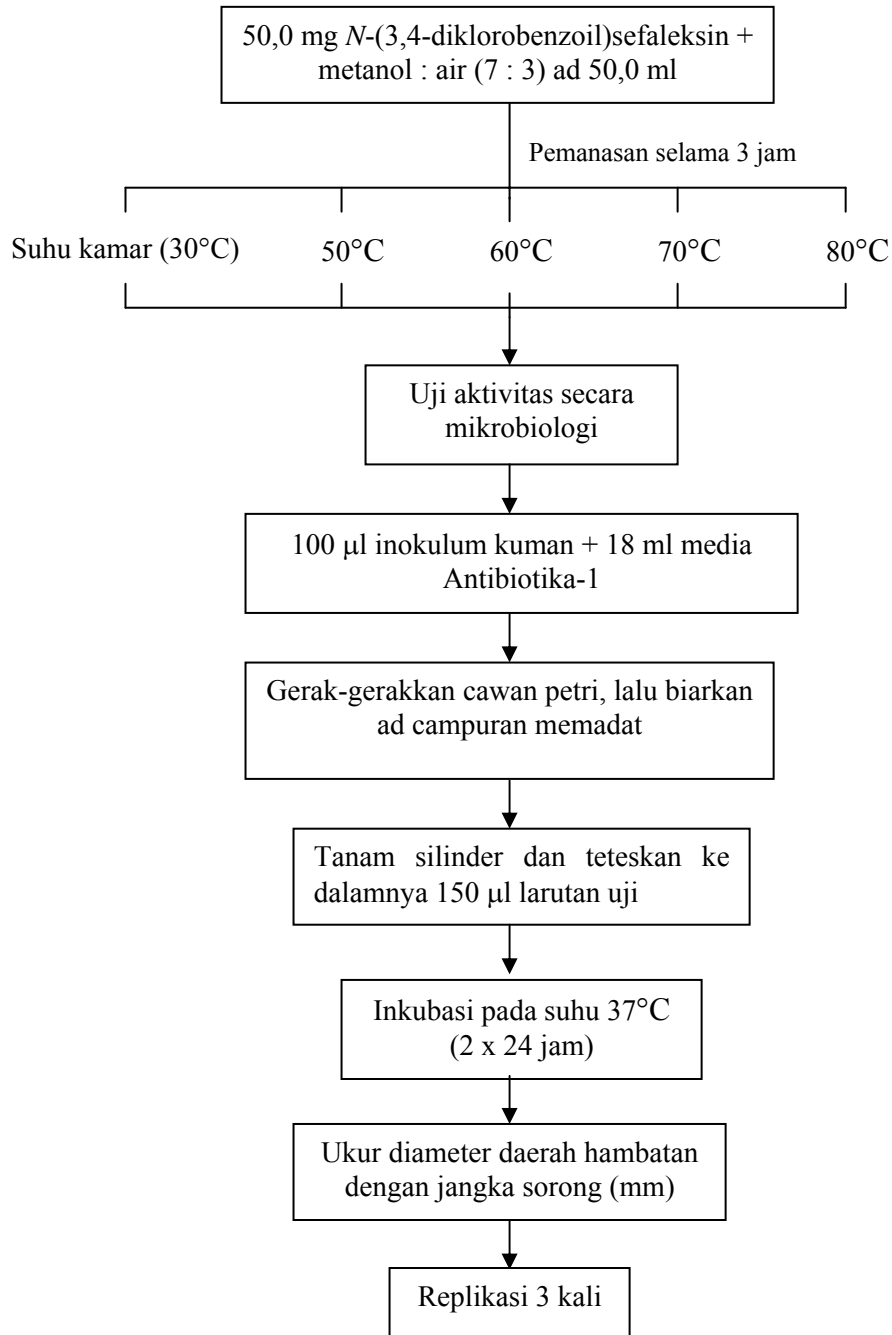
1 Rancangan Penelitian

1.1 Penetapan Kadar Senyawa Aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin secara Iodometri



Gambar 4.1 Rancangan penelitian untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dengan metode iodometri

1.2 Uji Aktivitas *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dengan Metode Difusi Silinder



Gambar 4.2 Rancangan penelitian uji aktivitas *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dengan metode difusi silinder

2 Bahan-bahan

2.1 Bahan-bahan untuk Penetapan Kadar Secara Iodometri

- (1) Amilum soluble p.a (Merck)
- (2) Asam asetat glasial p.a (Merck)
- (3) Asam sulfat p.a (Riedel-de Haën AG)
- (4) Asam klorida p.a (Riedel-de Haën AG)
- (5) *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin (diperoleh dari Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya)
- (6) Iodium p.a (Kimia Farma)
- (7) Kalium iodida p.a (Farak)
- (8) Kalium iodat p.a (Merck)
- (9) Natrium asetat p.a (Riedel-de Haën AG)
- (10) Natrium hidroksida p.a (Riedel-de Haën AG)
- (11) Natrium tiosulfat p.a (Merck)
- (12) Metanol p.a (Merck)

2.2 Bahan-bahan untuk Penentuan Aktivitas secara Mikrobiologis

- (1) *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin (diperoleh dari Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya)
- (2) Natrium klorida isotonis (Otsuka)
- (3) Kuman *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Fakultas Kedokteran Hewan)
- (4) Media Antibiotika-1 (Oxoid)

3 Alat-alat

- (1) *Thermostatic Bath* (Julabo EM)
- (2) Perangkat alat titrasi
- (3) Perangkat alat uji mikrobiologis
- (4) *Melting Point Apparatus Fisher-Johns*
- (5) Autoklaf (All American)
- (6) Inkubator (Mommert model no. 8540)
- (7) Jangka sorong (Chuan Brand)

- (8) pH-meter (Fischer accument tipe 230 A)
- (9) Spectronic 20 (Bausch and Lomb)
- (10) Neraca analitik "Sartorius" (tipe 2472)
- (11) Laminar Air Flow (Kottermann model No. 8580)

4 Cara Pelaksanaan

4.1 Pemeriksaan Kualitatif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin

4.1.1 Pemeriksaan Organoleptis

Meliputi pemeriksaan warna, bentuk, bau dan rasa.

4.1.2 Reaksi Warna (Anonim, 1986)

- (1) Campur 1 ml zat dengan 1 ml hidrosilamin 3 N dan 1 ml NaOH 3,3 N, diamkan selama 3 menit. Kemudian tambahkan 1 ml HCl 3,5 N dan 0,5 ml ferriammoniumsulfat 25 % dalam H₂SO₄ 0,1 N.

4.1.3 Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis (Hardjono, 2002)

Pelarut : aseton

Fasa diam : silika gel 60 GF 254 (E Merck)

Fasa gerak : 1. aseton : metanol : kloroform = 1 : 1 : 3
2. aseton : etanol : kloroform = 2 : 2 : 1

Penampak noda : lampu UV-254 nm

(Adanya noda tunggal pada berbagai fasa gerak menunjukkan bahwa senyawa yang diuji merupakan senyawa tunggal).

4.1.4 Pemeriksaan Titik Lebur

Sedikit bahan digerus halus kemudian diletakkan pada cekungan tempat zat dan ditutup dengan cover glass. Hubungkan alat dengan sumber listrik dan saklar pada posisi "ON". Amati suhu ketika bahan mulai meleleh pertama kali sampai meleleh seluruhnya.

4.2 Pembuatan Larutan Uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin untuk Penetapan Kadar secara Iodometri dan Mikrobiologi

- Ditimbang seksama 50,0 mg senyawa, larutkan dalam pelarut campur metanol-air (7 : 3) sampai volume 50,0 ml (1000 mg/liter).
- Larutan uji dipanaskan pada suhu konstan 50 °C selama 3 jam.
- Pemanasan dihentikan dan segera didinginkan.
- Lakukan pemanasan dengan cara yang sama pada larutan sampel pada suhu 60°C, 70°C, dan 80°C. Lakukan juga perlakuan pada suhu kamar (30°C).

4.3 Penetapan Kadar Senyawa Aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)-sefaleksin secara Iodometri

4.3.1 Pembuatan Larutan Baku Primer Kalium Iodat 0,02 N (Anonim, 1979)

Ditimbang seksama 0,0357 g Kalium Iodat P dan dilarutkan dalam air suling sampai volume 50,0 ml.

4.3.2 Pembuatan Larutan Natrium Tiosulfat 0,02 N (Anonim, 1979)

Ditimbang seksama 2,4818 g Natrium Tiosulfat dan dilarutkan dalam air suling sampai volume 500,0 ml.

4.3.3 Pembuatan Larutan Asam Sulfat 2 N

Encerkan 0,5 ml Asam Sulfat P dengan air sampai volume 10,0 ml.

4.3.4 Pembuatan Indikator Larutan Amilum (Anonim, 1979)

Ditimbang 0,05 g Amilum Soluble dan dilarutkan dalam 5 ml air. Ditambahkan air sambil terus diaduk hingga volume 10 ml. Didihkan selama beberapa menit, dinginkan dan saring.

4.3.5 Pembakuan Larutan Natrium Tiosulfat dengan Larutan Baku Primer Kalium Iodat

Dipipet 5,0 ml larutan Kalium Iodat ditambah 2,5 ml Asam Sulfat 2 N dan 75 mg Kalium Iodida. Ditambahkan indikator amilum dan dititrasi dengan larutan baku Natrium Tiosulfat sampai warna biru tepat hilang. Penambahan indikator amilum dilakukan saat akan mencapai titik akhir titrasi.

4.3.6 Pembuatan Larutan Iodium 0,02 N (Anonim, 1979)

Kalium Iodida P ditimbang 1,8 g, dilarutkan dalam 30-40 ml air suling dalam labu takar bersumbat 500,0 ml. Ditambahkan 1,269 g Iodium P lalu masukkan dalam labu takar bersumbat yang berisi larutan kalium iodida P. Ditambahkan air suling sampai volume 500,0 ml dan dikocok kuat agar iodium benar-benar larut.

4.3.7 Pembakuan Larutan Iodium dengan Larutan Natrium Tiosulfat

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

4.3.8 Pembuatan Larutan NaOH 0,5 N (Anonim, 1979)

Larutkan 0,5 g Natrium Hidroksida P dalam air sampai volume 25,0 ml.

4.3.9 Pembuatan Larutan Asam Klorida 0,75 N (Anonim, 1979)

Encerkan 3,2 ml Asam Klorida P dengan air sampai volume 50,0 ml.

4.3.10 Pembuatan Larutan Dapar Asetat

Larutkan 13,6 g Natrium Asetat P dan 6 g Asam Asetat Glasial P dalam 250,0 ml air. Aduk ad larut dan homogen.

4.3.11 Penetapan Kadar Senyawa Aktif dan Tidak Aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin

Dimasukkan 5,0 ml larutan uji (1000 mg/liter) dalam erlenmeyer bertutup. Ditambahkan 10 ml larutan dapar asetat dan 12,50 ml larutan iodium 0,02 N. Tutup erlenmeyer dan biarkan selama 20 menit terlindung dari cahaya. Titrasi dengan larutan natrium tiosulfat 0,02 N menggunakan indikator larutan amilum, sampai warna biru tepat hilang. Volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi dinyatakan dengan **A**.

Lakukan dengan cara yang sama pada larutan sampel yang telah mengalami perlakuan pemanasan pada suhu 50°C, 60°C, 70°C, dan 80°C.

4.3.12 Penetapan Kadar Senyawa Tidak Aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)-sefaleksin (Anonim, 1979)

Dimasukkan 5,0 ml larutan uji (1000 mg/liter) ke dalam erlenmeyer bertutup. Ditambahkan 1,5 ml natrium hidroksida 0,5 N dan biarkan selama 5 menit. Tambahkan 10 ml larutan dapar asetat; 2,5 ml asam klorida 0,75 N dan 12,50 ml larutan iodium 0,02 N. Tutup erlenmeyer dan biarkan selama 20 menit terlindung dari cahaya. Titrasi dengan larutan natrium tiosulfat 0,02 N menggunakan indikator larutan amilum, sampai warna biru tepat hilang. Volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi dinyatakan dengan **B**.

Lakukan dengan cara yang sama pada larutan sampel yang telah mengalami perlakuan pemanasan pada suhu 50°C, 60°C, 70°C, dan 80°C.

4.3.13 Rumus Perhitungan Kadar Senyawa Aktif

$$\% \text{kadar} = \frac{(A - B) \times N \times E}{0,02 \times W} \times \frac{BM_{N-(3,4\text{-diklorobenzoil})\text{sefaleksin}}}{BM_{\text{sefaleksin monohidrat}}} \times 100\%$$

dimana,

A = volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa aktif dan tidak aktif (ml)

B = volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa tidak aktif (ml)

N = normalitas larutan natrium tiosulfat (N)

E = kesetaraan tiap 0,02 N larutan iodium dengan 1,761 mg senyawa sefaleksin monohidrat

W = kandungan *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam 5,0 ml larutan uji (mg)

$$BM_{\text{sefaleksin monohidrat}} = 365,40$$

$$BM_{N-(3,4\text{-diklorobenzoil})\text{-sefaleksin}} = 520,39$$

4.3.14 Replikasi

Penetapan kadar dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 3 hasil penetapan kadar secara iodometri.

4.4 Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

(1) Pewarnaan Kuman (Cruickshank, 1986)

Suspensi kuman dalam air suling steril pada gelas objek dikeringkan di udara terbuka dan difiksir dengan cara melewatkan gelas objek di atas api lampu spiritus beberapa kali. Kristal violet dituang pada gelas objek dan dibiarkan selama 1 menit. Sisa kristal violet dituang dan diganti dengan larutan lugol, biarkan selama 1 menit, lalu cuci dengan air suling. Warna yang terbentuk dihilangkan dengan alkohol 95% selama 10-20 detik, segera bilas dengan air, lalu safranin dituangkan selama 10-30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

(2) Tes Koagulase (Jawetz *et al.*, 1991)

Pada 0,5 ml biakan kuman dalam media cair ditambah 0,5 ml plasma, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan reaksi yang positif yaitu dengan terbentuknya gumpalan dalam waktu 1-4 jam.

- (3) **Tes pada Agar Garam Manitol** (Finegold and Martin, 1982; Presscot, 2002)

Staphylococcus aureus ditanam pada media agar garam manitol. Diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan lingkaran kuning disekeliling pertumbuhan pada media agar garam manitol.

4.5 Uji Aktivitas Antibakteri N-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

4.5.1 Pembuatan Media Antibiotika-1

Media Antibiotika-1 ditimbang sebanyak 27 g dan dilarutkan dalam 1 liter air, biarkan selama 15 menit. Kemudian dididihkan sampai terbentuk larutan yang jernih. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 18 ml dan kemudian media disterilkan di otoklaf selama 30 menit pada suhu 115°C.

4.5.2 Penyiapan Bakteri Uji (Anonim, 1995)

Biakan mikroba ditanam di permukaan media Antibiotika-1 miring dalam tabung reaksi secara merata. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Satu ose koloni mikroba dari biakan padat disuspensikan dalam larutan natrium klorida isotonis sebanyak 5 ml dan dikocok. Serapan suspensi kuman diukur dengan spektrofotometer ultra lembayung pada panjang gelombang 580 nm sedemikian rupa sehingga dengan pengenceran tertentu diperoleh transmitan 25%. Sebagai blanko digunakan larutan natrium klorida P 0,9%.

4.5.3 Penentuan Aktivitas Antibakteri

- Ke dalam cawan petri dengan diameter 9 cm dimasukkan secara aseptis 100 µl inokulum kuman (dilakukan orientasi sehingga didapatkan sejumlah inokulum bakteri yang dapat memberikan daerah hambatan yang jelas terlihat).

- Media Antibiotika-1 steril sebanyak 18 ml suhu 42-50⁰ C dituang ke dalam cawan petri yang berisi inokulum kuman.
- Campuran media agar dan inokulum kuman dibuat homogen dengan menggerakkan cawan petri beberapa kali secara teratur lalu dibiarkan memadat.
- Silinder logam diletakkan pada permukaan agar yang telah memadat.
- Isikan larutan uji 4.2 ke dalamnya sebanyak 150 μ l.
- Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.
- Diameter daerah hambatan diukur dengan mengukur daerah jernih di sekeliling silinder dengan menggunakan jangka sorong.

4.5.4 Replikasi

Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali.

4.6 Analisa Data

Dari hasil pengamatan pada masing-masing larutan uji akan diperoleh 2 variabel, yaitu :

- Variabel x : kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dari larutan uji yang ditetapkan secara iodometri, setelah mengalami degradasi pada berbagai suhu (% b/b).
- Variabel y : diameter daerah hambatan pertumbuhan senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin setelah mengalami degradasi pada berbagai suhu (mm).

Untuk mengetahui ada tidaknya korelasi linier antara variabel x dan y dilakukan uji regresi dan perhitungan koefisien korelasi dengan menggunakan program komputer SPSS 11.0 (analisis regresi linier) pada $\alpha = 0,05$.

Jika r hitung $>$ r tabel, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi linier antara variabel x dan y sehingga untuk selanjutnya dapat dibuat persamaan regresi :

$$y = bx + a$$

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

Ho : tidak ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ha : ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

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

BAB V**HASIL PENELITIAN****1 Hasil Pemeriksaan Kualitatif terhadap *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin**

Hasil pemeriksaan kualitatif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dan data pustaka tercantum dalam tabel V.1.

Tabel V.1 Hasil pemeriksaan kualitatif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin

No.	Pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan	Pustaka
1.	Organoleptis		
	a. Bentuk	Amorf	Amorf
	b. Warna	Putih tulang	Putih tulang
	c. Bau	Berbau khas	Berbau khas
2.	Reaksi warna		
	a. Zat + NH ₂ OH.HCl + NaOH + HCl + FeCl ₃	Merah-ungu	Merah-ungu
3.	Titik lebur (°C)	196 -197	196 - 197

2 Hasil Pemeriksaan KLT

Pemeriksaan KLT dilakukan berdasarkan cara pada 4.1.3. Pemeriksaan dilakukan untuk mengetahui kemurnian senyawa. Hasil KLT senyawa pada 2 macam fase gerak yang berbeda dapat dilihat pada tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil KLT senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin pada berbagai fase gerak

Fase gerak	Jarak migrasi (cm)		Rf	Warna noda	Jumlah noda
	Analit	Fase gerak			
1	1,65	7,9	0,21	Ungu	Satu noda
2	2,80	7,9	0,35	Ungu	Satu noda

Keterangan :

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak migrasi analit (cm)}}{\text{Jarak migrasi fase gerak (cm)}}$$

Pelarut : aseton

Fasa diam : silika gel 60 GF 254 (E Merck)

Fasa gerak : 1. aseton : metanol : kloroform = 1 : 1 : 3
2. aseton : etanol : kloroform = 2 : 2 : 1

Penampak noda : lampu UV-254 nm

3 Hasil Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pada penelitian ini tidak dilakukan identifikasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 karena telah ada surat keterangan dari instansi terkait mengenai bakteri yang bersangkutan.

4 Hasil Penetapan Kadar Senyawa Aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin secara Iodometri

Hasil penetapan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin secara iodometri pada suhu kamar (30°C) dan hasil pemanasan pada suhu 50°C, 60°C, 70 °C, dan 80°C selama 3 jam pada pH 5,20 dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Dengan notasi :

A = ml Natrium Tiosulfat yang digunakan untuk titrasi larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin sebelum dihidrolisis dengan NaOH.

B = ml Natrium Tiosulfat yang digunakan untuk titrasi larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin setelah dihidrolisis dengan NaOH.

Tabel V.3 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin pada suhu kamar (30°C)

No.	Kandungan <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam 5,0 ml sampel (mg)	Normalitas Na ₂ S ₂ O ₃ (N)	ml Na ₂ S ₂ O ₃ yang digunakan untuk titrasi		Kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang diperoleh (% b/b)
			A	B	
1.	5,10	0,0206	11,55	10,00	78,58
2.	5,00	0,0206	11,80	10,30	77,56
3.	5,04	0,0197	11,85	10,25	78,52
% kadar rata-rata senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin					
78,22 ± 0,47					

Tabel V.4 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 50°C

No.	Kandungan <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam 5,0 ml sampel (mg)	Normalitas Na ₂ S ₂ O ₃ (N)	ml Na ₂ S ₂ O ₃ yang digunakan untuk titrasi		Kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang diperoleh (% b/b)
			A	B	
1.	5,02	0,0196	11,45	10,10	66,39
2.	5,05	0,0196	11,20	9,85	65,94
3.	5,07	0,0196	11,40	10,05	65,68
% kadar rata-rata senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin					
66,00 ± 0,29					

Tabel V.5 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 60°C

No.	Kandungan <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam 5,0 ml sampel (mg)	Normalitas Na ₂ S ₂ O ₃ (N)	ml Na ₂ S ₂ O ₃ yang digunakan untuk titrasi		Kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang diperoleh (% b/b)
			A	B	
1.	5,01	0,0197	10,25	9,05	59,08
2.	5,03	0,0197	10,30	9,10	58,85
3.	5,04	0,0197	10,25	9,05	58,73
% kadar rata-rata senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)-sefaleksin 58,89 ± 0,14					

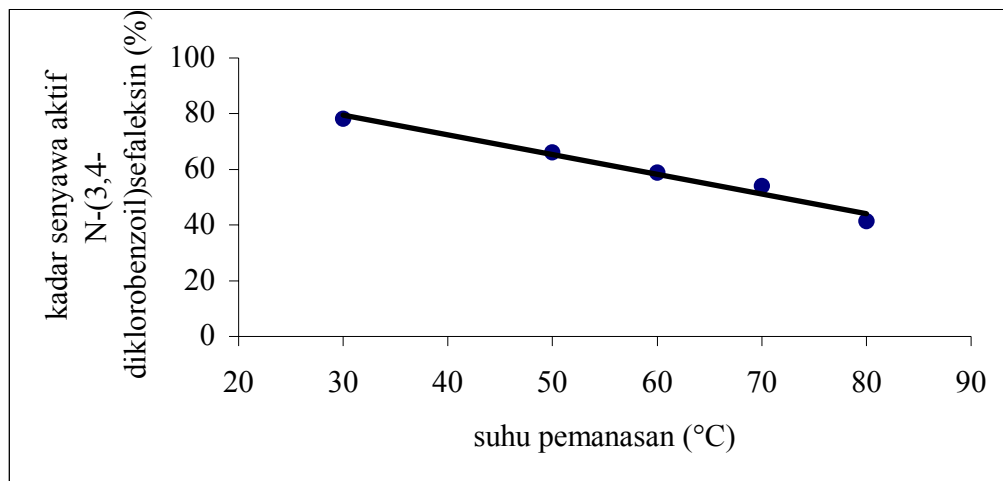
Tabel V.6 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 70°C

No.	Kandungan <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam 5,0 ml sampel (mg)	Normalitas Na ₂ S ₂ O ₃ (N)	ml Na ₂ S ₂ O ₃ yang digunakan untuk titrasi		Kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang diperoleh (% b/b)
			A	B	
1.	5,02	0,0206	11,50	10,45	54,08
2.	5,00	0,0196	12,05	10,95	54,09
3.	5,04	0,0196	11,30	10,20	53,66
% kadar rata-rata senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin 53,94 ± 0,20					

Tabel V.7 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin hasil pemanasan pada suhu 80°C

No.	Kandungan <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam 5,0 ml sampel (mg)	Normalitas Na ₂ S ₂ O ₃ (N)	ml Na ₂ S ₂ O ₃ yang digunakan untuk titrasi		Kadar senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang diperoleh (% b/b)
			A	B	
1.	5,01	0,0206	10,45	9,65	41,28
2.	5,05	0,0206	10,75	9,95	40,96
3.	5,02	0,0196	10,80	9,95	41,63
% kadar rata-rata senyawa aktif <i>N</i> -(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin					
41,29 ± 0,27					

Hubungan antara suhu pemanasan dengan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dapat digambarkan dalam suatu kurva seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.1.

Gambar 5.1 Kurva hubungan antara suhu pemanasan (°C) dengan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri

5 Hasil penentuan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Hasil penentuan diameter daerah hambatan *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin, dengan larutan uji 150 µl dan jumlah suspensi bakteri 100 µl, terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tercantum dalam tabel V.8.

Tabel V.8 Diameter daerah hambatan larutan uji *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

No.	Kadar (%)	Diameter daerah hambatan (mm)			
		1	2	3	Rata-rata
1.	78,22	24,10	24,05	22,34	23,50 ± 0,82
2.	66,00	23,72	22,96	21,56	22,74 ± 0,89
3.	58,89	21,16	19,84	19,54	20,18 ± 0,70
4.	53,94	18,54	18,58	18,50	18,54 ± 0,03
5.	41,29	17,40	16,89	17,53	17,27 ± 0,28

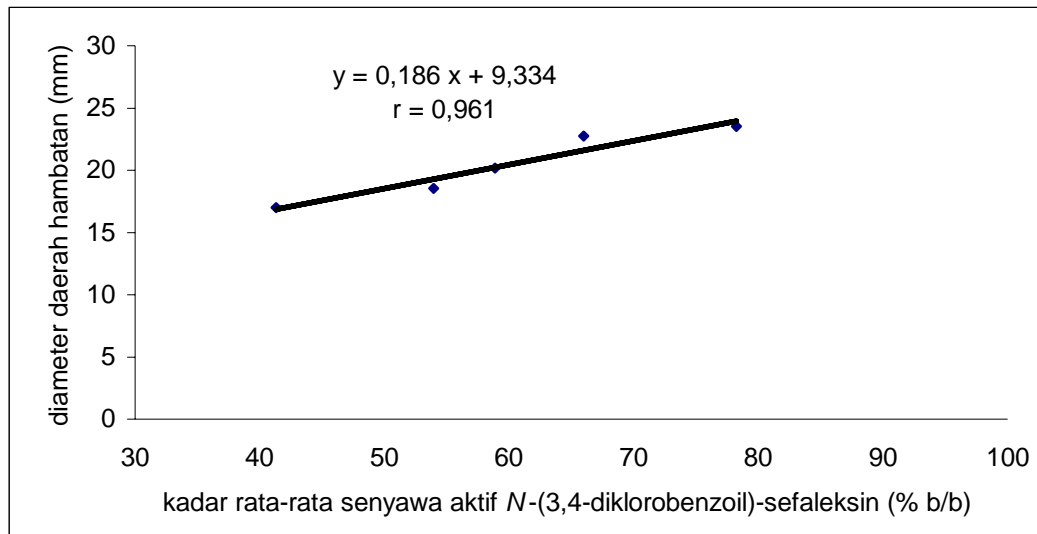
6 Hubungan antara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif N-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang Ditetapkan secara Iodometri dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Tabel V.9 Hubungan antara kadar rata-rata senyawa aktif N-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

No.	Kadar rata-rata senyawa aktif N-(3,4-diklorobenzoil) sefaleksin (%) x	Diameter daerah hambatan (mm) y
1.	78,22	23,50
2.	66,00	22,74
3.	58,89	20,18
4.	53,94	18,54
5.	41,29	17,27

Berdasarkan uji korelasi dalam lampiran 5 didapat harga r hitung = 0,961 dan harga r tabel ($\alpha = 0,05$; dB = 3) = 0,878. Maka r hitung > r tabel, dengan demikian ada hubungan linier antara variabel x dan variabel y. Hubungan linier tersebut dapat dinyatakan dengan persamaan :

$$y = 0,186 x + 9,335$$



Gambar 5.1 Kurva persamaan garis regresi antara kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Setelah didapatkan persamaan garis regresi, maka untuk mengevaluasi persamaan tersebut digunakan uji distribusi F dengan program komputer SPSS 11.0, dimana hipotesis nol menyatakan tidak ada hubungan antara variabel x dengan variabel y, dan sebaliknya dengan hipotesis alternatif menyatakan ada hubungan bermakna antara variabel x dengan variabel y.

Berdasarkan hasil analisis data dalam lampiran 5 didapat bahwa harga F hitung = 35,995. Sedangkan harga F tabel ($\alpha = 0,05$; dB = 3) = 10,13. Karena F hitung > F tabel maka hipotesis nol ditolak dan hipotesis alternatif diterima sehingga dapat dinyatakan ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada hubungan linier antara kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Berdasarkan hasil uji organoleptis, reaksi warna, pemeriksaan titik lebur dan pemeriksaan kromatografi lapis tipis (KLT), dapat diketahui bahwa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin telah memenuhi spesifikasi sebagai bahan penelitian.

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan melarutkan bahan, *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin, dalam pelarut campur metanol-air dengan perbandingan metanol : air = 7 : 3. *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin merupakan senyawa yang memiliki sifat lipofilitas yang tinggi sehingga kelarutan dalam air rendah. Dibandingkan kelarutan senyawa dalam metanol, *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin lebih mudah larut dalam pelarut aseton. Namun mengingat sifat aseton yang lebih mudah menguap dan larutan uji harus dipanaskan untuk mendapatkan kadar senyawa aktif yang bervariasi maka dalam penelitian ini dipilih pelarut campur metanol-air untuk mengurangi kemungkinan terjadinya penguapan saat pemanasan.

Untuk mendapatkan larutan uji dengan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang bervariasi dilakukan pemanasan pada berbagai suhu. Pemanasan dilakukan pada suhu 50°C, 60°C, 70°C, 80°C dan pendinginan pada suhu kamar (30°C) selama 3 jam. Untuk menghindari peruraian lebih lanjut maka setelah pemanasan larutan uji langsung didinginkan dalam air dingin (air es).

Penentuan kadar larutan uji dengan pemanasan merupakan metode yang lazim digunakan untuk memprediksikan stabilitas suatu obat. Dengan metode kenaikan suhu ini, dapat dianalogikan keadaan suatu obat yang akan diteliti dengan keadaan obat pada waktu penyimpanan maupun keadaan obat pada waktu proses pembuatan menjadi suatu sediaan jadi.

Dalam penelitian ini pemanasan hanya dilakukan selama 3 jam dengan asumsi bahwa waktu tersebut cukup panjang untuk mendapatkan berbagai kadar senyawa aktif yang perbedaannya cukup signifikan. Pemanasan pada suhu 40 °C tidak dilakukan dengan asumsi bahwa dengan suhu tersebut tidak terdapat perbedaan kadar yang cukup besar dengan kadar larutan uji pada pendinginan pada suhu kamar.

Menurut data stabilitas dari pustaka diketahui bahwa selain dipengaruhi oleh pemanasan, proses hidrolisis *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin juga dipengaruhi oleh pH dan waktu penyimpanan (Lund, 1994). Untuk menghindari peruraian *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang disebabkan oleh faktor-faktor di luar pemanasan maka kondisi perlakuan antar sampel diusahakan sama. Setelah pemanasan, larutan uji disimpan di lemari es untuk mencegah peruraian senyawa aktif lebih lanjut. Pada hari berikutnya baru dilakukan penetapan kadar senyawa aktif secara iodometri dan uji aktivitas antibakteri secara mikrobiologi. Larutan uji dibagi dua, sebagian ditetapkan kadar senyawa aktif secara iodometri dan sebagian lagi ditentukan aktivitas antibakterinya.

Menurut pustaka, dengan metode iodometri kadar senyawa aktif dapat diketahui dari hasil pengurangan volume titrasi sebelum larutan uji dihidrolisis dengan NaOH (A) dengan volume titrasi setelah larutan uji dihidrolisis dengan NaOH (B) (Anonim, 1979). Pada penelitian ini, dalam perhitungan kadar senyawa aktif digunakan cara yang sama dengan yang tercantum dalam pustaka yaitu dengan mengurangi volume titrasi sebelum larutan uji dihidrolisis dengan NaOH 0,5 N (A) dengan volume titrasi setelah larutan uji dihidrolisis dengan NaOH 0,5 N (B).

Metode iodometri merupakan metode yang cocok digunakan untuk menetapkan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin karena prinsip dari metode ini adalah iodium hanya dapat berikatan dengan *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang telah terpecah struktur molekulnya (Florey, 1975). Selain itu, dengan iodometri tidak diperlukan adanya senyawa standar sehingga metode ini sangat cocok digunakan untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang merupakan senyawa baru dan belum ada senyawa standar sebagai pembandingnya.

Setelah dilakukan perhitungan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dalam larutan uji hasil pemanasan pada suhu yang bervariasi diperoleh hasil yaitu pada suhu kamar (30°C) kadar senyawa aktif sebesar 78,22 %, pada pemanasan 50°C sebesar 66,00 %, pada suhu 60°C sebesar 58,89 %, pada suhu 70°C sebesar 53,94 % dan pada suhu 80°C sebesar 41,29 %. Hubungan antara suhu pemanasan dengan kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin dapat digambarkan seperti dalam gambar 5.1.

Dari gambar tersebut dapat dilihat makin tinggi suhu pemanasan maka makin kecil kadar senyawa aktif dalam larutan uji tersebut. Ini berarti kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin berbanding terbalik dengan suhu pemanasan, dimana makin tinggi suhu pemanasan maka makin kecil kadar senyawa aktifnya. Hasil yang diperoleh membuktikan bahwa pemanasan menyebabkan makin banyak cincin β -laktam yang pecah sehingga berpengaruh pada kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin karena kadar senyawa aktif ditentukan oleh jumlah cincin β -laktam yang utuh.

Penentuan diameter daerah hambatan dilakukan dengan metode difusi silinder dengan menggunakan media Antibiotika-1. Pembuatan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan sesuai dengan cara yang tercantum dalam Farmakope Indonesia edisi IV. Inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang digunakan diperoleh dengan cara mengukur transmittan suspensi bakteri dalam larutan natrium klorida isotonis. Dengan pengenceran tertentu dengan larutan natrium klorida isotonis harus didapatkan transmittan 25 % untuk suspensi bakteri tersebut yang dibandingkan dengan blangko larutan natrium klorida isotonis sebagai transmittan 100 %. Sehingga diperoleh inokulum bakteri yang memenuhi persyaratan seperti yang tercantum dalam Farmakope Indonesia edisi IV.

Untuk mendapatkan diameter daerah hambatan yang mudah diamati maka dilakukan percobaan pendahuluan (orientasi) dengan mengubah-ubah jumlah inokulum bakteri dan jumlah larutan uji yang digunakan. Orientasi dilakukan pada larutan uji hasil pemanasan pada suhu 80°C dan larutan uji tanpa pemanasan. Pertumbuhan bakteri yang merata dengan batas diameter daerah jernih dan keruh

di sekeliling silinder yang jelas dan mudah diamati diperoleh dengan jumlah inokulum bakteri 100 µl dan jumlah larutan uji 150 µl.

Dilakukan juga orientasi waktu inkubasi antara 1 x 24 jam dan 2 x 24 jam. Hasil orientasi menunjukkan waktu inkubasi 2 x 24 jam memberikan diameter daerah hambatan atau daerah jernih yang lebih jelas daripada inkubasi selama 1 x 24 jam. Pada inkubasi 1 x 24 jam (hari pertama) batas daerah jernih dan keruh kurang jelas bila dibandingkan dengan 2 x 24 jam (hari kedua). Pada hari kedua diameter daerah jernih yang terjadi lebih besar daripada hari pertama. Hal ini disebabkan karena pada hari kedua semua larutan uji telah berdifusi ke media sehingga hambatan terhadap bakteri yang ada makin besar. Suhu inkubasi yang digunakan adalah suhu 37°C. Suhu ini dipilih karena suhu ini merupakan suhu optimal pertumbuhan dari bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sesuai yang tercantum dalam pustaka (Jawetz, *et al.*, 1991). Diameter daerah hambatan yang ada kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Dari hasil penentuan diameter daerah hambatan senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin pada larutan uji dengan pemanasan pada suhu yang bervariasi diperoleh bahwa larutan uji hasil pemanasan pada suhu yang lebih tinggi menghasilkan diameter daerah hambatan yang lebih kecil. Hal ini menunjukkan bahwa pemanasan menyebabkan makin banyak cincin β-laktam yang pecah sehingga berpengaruh pada aktivitas antibakteri *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin karena aktivitas antibakteri *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin ditentukan oleh jumlah cincin β-laktam yang utuh.

Untuk mengetahui hubungan antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri dari senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin maka dilakukan uji regresi (pembuatan persamaan garis regresi), dengan kadar senyawa aktif sebagai variabel *x* dan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebagai variabel *y*. Uji regresi dilakukan menggunakan program komputer SPSS 11.0. Dari uji regresi diperoleh persamaan regresi $y = 0,186 x + 9,335$, dengan koefisien korelasi (r) = 0,961. Koefisien korelasi dari hasil perhitungan lebih besar daripada harga koefisien korelasi tabel (r tabel = 0,878). Ini berarti ada hubungan linier antara variabel *x* dengan variabel *y*, pada batas kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin 41,29 % – 78,22 %.

Untuk mengevaluasi persamaan garis digunakan uji F (ANOVA) pada $\alpha = 0,05$ dengan menggunakan program komputer SPSS 11.0 dan diperoleh harga F hitung = 35,995. Jika dibandingkan dengan harga F tabel ($\alpha = 0,05$; dB = 3) maka F hitung (35,995) > F tabel (10,13) yang berarti persamaan garis regresi yang diperoleh cukup signifikan untuk memprediksikan variabel y dari variabel x atau ada hubungan linier yang bermakna antara variabel x dengan variabel y.

Dengan asumsi bahwa hanya struktur senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang memberikan diameter daerah hambatan maka hubungan yang diperoleh dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar senyawa aktif *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri mampu menggambarkan aktivitasnya. Larutan uji yang memiliki kadar senyawa aktif tinggi secara iodometri memberikan aktivitas mikrobiologi yang tinggi pula.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa ada hubungan linier antara kadar senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada $\alpha = 0,05$, yang dinyatakan dengan persamaan garis $y = 0,186 x + 9,335$ ($n = 5$; $r = 0,961$; $F = 35,995$).

2 Saran

Agar tidak terjadi perubahan kadar senyawa aktif dan aktivitas antibakteri maka penyimpanan senyawa *N*-(3,4-diklorobenzoil)sefaleksin paling baik dilakukan pada suhu tidak lebih dari 30°C.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1979. *Farmakope Indonesia edisi III*, Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 136-137, 694, 744, 746-749.
- Anonim, 1986. *Basic Test for Pharmaceutical Substances*, Genewa : The World Health Organization, p. 36-37.
- Anonim, 1990. *The United States of Pharmacopeia*, 23rd edition, Rockville : The United States of Pharmacopeia Convention Inc, p. 1690-1696.
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia edisi IV*, Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 891-899, 1032.
- Black, Jacquelyn. G., 1999. *Microbiology : Principles and Exploration*, 4th edition, New Jersey : Prentice Hall Inc, p. 351-354.
- Bonang, G., Enggar, S. K., 1982. *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik*, Jakarta : CV. EGC, hal. 294-299.
- Budavari, S., 1996. *The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals, Drugs,, and Biologicals*, 12th edition, Whitehouse Station : Merck & Co., Inc, p. 328.
- Cappucino J.G. and Sherman S., 1987. *Microbiology A Laboratory Manual*, 2nd ed., California: The Benjamin/Cumming Publishing Company, p. 361-362.
- Cochran W.G., 1977, *Sampling Techniques*, 3th ed., New York; Jhon Wiley and Sons, p. 23-26.
- Cruickshank, R. (editor), 1986. *Medical Microbiology : A Guide to Laboratory Diagnosis and Control Infection*, 11th edition, Baltimore : The William and Wrikins Company, p. 745-751, 892-897.
- Daniel, W. W., 1976. *Biostatisic : A Foundation Analysis in The Health Science*, 2nd edition, New York : John Willey and Sons, p. 203-249.
- Dinner, A., 1977. Cephalosporin Degradation, *J. of Med. Chem.*, vol. 20 No. 7, p. 963-965.

- Florey, K., 1975. *Analytical Profile of Drug Substances*, vol. IV, New York : Academic Press, 21-43.
- Freeman B.A., 1985. *Burrows Text Book of Microbiology*, 22nd ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 447-448.
- Gan, V. H. S., Iswanto Y. H., 1995. Penisilin, Sefalosporin dan Antibiotika Beta-Laktam Lainnya, dalam Sulistia Gan (editor), *Farmakologi dan Terapi*, edisi 4, Jakarta : Bagian Farmakologi Universitas Indonesia, hal. 636-642.
- Hardjono, S., 2002. *Sintesis Senyawa Baru Turunan Benzoin-N-Sefaleksin untuk Meningkatkan Aktivitas Antibakteri terhadap Pseudomonas aeruginosa*, Jakarta : Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia, hal. 1-17.
- Higuchi, T. And Hanssen, E. B. (editor), 1969. *Pharmaceutical Analysis*, New York : Interscience Publisher, p. 597-604.
- Jawetz, Melnick and Adelberg's, 1991. *Medical Microbiology*, 19th edition, Connecticut : Prentice-Hall International Inc, p. 49-55, 154-155, 194, 224, 212-214.
- Kolthoff, I. M., Sandell, E. B., 1952. *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis*, 3th edition, New York : The Mac Millan Company, p. 585-605.
- Lim, D., 1998. *Microbiology*, 2nd edition, Boston : Mc Graw-Hill, p.132-133.
- Lund, W., 1994. *The Pharmaceutical Codex : Principles and Practice of Pharmaceutics*, 12th edition, London : The Pharmaceutical Press, p. 780-782.
- Martin, A. R., Doerge, R. F., 1982. terjemahan oleh Fatah, A. M., *Buku Teks Wilson and Gisvold : Kimia Farmasi dan Medisinal Organik*, Semarang : IKIP Semarang Press, hal. 231-263.
- Morin, R. B., Gorman, M., 1982. *Kimia dan Biologi Antibiotik β -Laktam*, volume 3, terjemahan Sri Mulyani, Semarang : IKIP Semarang Press, hal. 151-196.
- Nogrady, T., 1992. *Kimia Medisinal, Pendekatan Secara Biokimiawi*, terjemahan Raslim Rasyid, Amir Musadad, Bandung, hal. 437-447.

- Parfitt, K., 1999. *Martindale : The Complete Drug Reference*, 32nd edition, London : The Pharmaceutical Press, p. 178.
- Pelezar, M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R., 1986. *Microbiology*, 5th edition, New York : Mc Graw Hill Book Company, p. 487-492.
- Reynolds, J.E.F., 1982. *Martindale : The Extra Pharmacopoeia*, 28th ed, London : Pharmaceutical Press, p. 1123-1125.
- Richel, W.A., 1988. *Handbook of Basic Pharmacokinetics*, 3th ed., Cincinate ; Drug Intelegence Publication Inc., p.315.
- Siswandono., dan Sukardjo. B., 1995. *Kimia Medisinal*, Surabaya : Airlangga University Press, hal. 369-375.
- Soedigdo S., Soedigdo P., 1977. *Pengantar Cara Statika Kimia*, Bandung ; Penerbit ITB Bandung, hal. 42.
- Smith. C. M. and A. M. Renard, 1992. *Textbook of Pharmacology*, Philadelphia : W. B. Saunders Company, p. 829, 834.
- Tjay, T. H., K. Rahardjo, 1991. *Obat-obat Penting, Khasiat dan Efek-efeknya*, edisi 4, cetakan ke-2, Jakarta : Percetakan Jayakarta, hal. 66, 74-77.
- Wattimena, J. R., Nelly, C. S., Mathilda, B. W., Elin, Y. S., Andreanus, A. S., Anna, R. S., 1991. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*, Yogyakarta : Gadjah Mada University Press, hal. 101-103.
- Yamana, T. and Tsuji, A., 1976. Comparative Stability of Cephalosporin in Aqueous Solution : Kinetics and Mechanism of Degradation. *J. of Pharm. Sci.*, vol 65 no. 11, p. 1563-1565.