

SKRIPSI

NIKE KUSUMAWATI

**HUBUNGAN KADAR DENGAN
AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI SEFALEKSIN DAN
N-BENZOILSEFALEKSIN**

**(Uji Aktivitas Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922)**



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

Lembar Pengesahan

**HUBUNGAN KADAR DENGAN
AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI SEFALEKSIN DAN
N-BENZOILSEFALEKSIN**

**(Uji Aktivitas Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922)**

SKRIPSI

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

2004

OLEH :

**NIKE KUSUMAWATI
050012233**

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

**Prof. Dr. Bambang Soekardjo, SU
NIP. 130355370**

Pembimbing Serta I

Pembimbing Serta II

**Drs. Robby Sondakh, MS
NIP. 130877634**

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

KATA PENGANTAR

Bismillaahirrahmaahim. Assalamu'alaikum wa rahmatullah.

Segala puji syukur hanya bagi Allah *Subahanahu wa ta'ala*, semata-mata atas ridlo-Nyalah saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “HUBUNGAN KADAR DENGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI SEFALEKSIN DAN N-BENZOILSEFALEKSIN (Uji Aktivitas Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922)” dengan sebaik-baiknya.

Pada kesempatan ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Bambang Soekardjo, SU., selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, dorongan moril, bantuan bahan penelitian dan izin penggunaan fasilitas laboratorium.
2. Bapak Drs. Robby Sondakh, MS. dan Ibu Ir. Rully Susilowati, MS., selaku pembimbing serta yang telah memberikan bimbingan, dorongan moril dan saran atas kelancaran skripsi ini.
3. Dr. Tutuk Budiati, MS. dan Dr. Djoko Agus Purwanto, MS., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan dalam perbaikan skripsi ini.
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya Prof.Dr. Noor Cholies Z. atas kesempatan yang diberikan kepada saya mengikuti program pendidikan program sarjana.
5. Ibu dan Bapak yang saya sayangi atas kasih sayang, doa, dorongan semangat, serta kesabaran dalam mendidik saya selama ini.
6. Bapak Drs. Achmad Radjaram, MS., dosen wali yang telah memberikan bimbingan selama saya belajar di Fakultas Farmasi.
7. Para dosen di Laboratorium Kimia Medisinal khususnya atas bantuan bimbingan dan dukungan morilnya, serta semua dosen di Fakultas Farmasi.

8. Para laboran : Pak Tukijo dan Mas Tanto di Laboratorium Kimia Medisinal serta Pak Bakir di Laboratorium Mikrobiologi atas bantuan tenaga selama saya bekerja.
 9. Saudaraku Reni yang telah membantu dalam dukungan moril selama ini.
 10. Partner kerjaku, Eko, yang telah banyak membantu mulai dari awal skripsi hingga akhir.
 11. Teman-teman kerjaku, Detik, Yuni, Yusi, Emi, Avri, Melanny, Nia, Pitri, Tyas, Danang dan Mas Wachid atas dukungan dan kebersamaannya selama ini.
 12. Semua pihak yang telah membantu kelancaran penyusunan skripsi ini.
- Tiada kesempurnaan kecuali Allah *Subahanahu wa ta'ala*. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Wassalamu'alaikum warahmatullah.*

Surabaya, Juli 2004

Penulis

RINGKASAN

HUBUNGAN KADAR DENGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI SEFALEKSIN DAN N-BENZOILSEFALEKSIN

(Uji Aktivitas Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922)

Nike Kusumawati

Salah satu proses dalam pengembangan obat baru adalah melakukan modifikasi struktur senyawa yang sudah diketahui aktivitasnya untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi senyawa baru dengan efek yang dikehendaki.

Golongan antibiotika yang sering digunakan untuk penanggulangan penyakit infeksi adalah golongan β -laktam, yaitu turunan penisilin dan sefalosporin, karena toksisitasnya relatif lebih rendah dibanding antibiotika lain.

Untuk meningkatkan aktivitas terhadap bakteri Gram-negatif telah dilakukan modifikasi pada gugus $-\text{NH}_2$ sehingga senyawa menjadi lebih bersifat asam dengan cara asilasi dengan gugus yang kompleks. Turunan asil-N-aminobenzilpenisilin yaitu N-benzoilampisilin ternyata mempunyai aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, suatu bakteri Gram-negatif yang sulit dibasmi, yang lebih besar dibanding senyawa induknya yaitu ampisilin.

Keberhasilan ampisilin inilah yang memberikan gagasan untuk melakukan berbagai variasi struktur modifikasi antibiotika golongan sefalosporin untuk mendapatkan sifat-sifat biologik / farmakokinetik yang lebih baik.

Turunan sefalosporin merupakan antibiotika yang digunakan untuk pengobatan terhadap infeksi bakteri yang resisten terhadap penisilin. Potensi sefaleksin sebagai bahan dasar pembuatan obat belum dikembangkan secara optimal. Melihat kemiripan struktur antara sefaleksin dan ampisilin dan mengingat bahwa cincin dihidrotiazin pada sefaleksin lebih stabil dibanding cincin tiazolidin pada ampisilin, maka dilakukan modifikasi struktur sefaleksin dalam usaha mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas antibakteri lebih tinggi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dibanding sefaleksin.

Penambahan gugus benzoil pada sefaleksin yaitu N-benzoilsefaleksin diharapkan stabilitasnya terhadap enzim β -laktamase juga meningkat karena gugus benzoil berperan dalam peningkatan lipofilitas bahan obat, yaitu semakin panjang atom C semakin lipofil sehingga bahan obat lebih mudah menembus membran sel bakteri. Gugus benzoil juga berperan dalam meningkatkan keasaman bahan obat sehingga senyawa menjadi lebih stabil dalam bentuk molekul sehingga kemungkinan untuk menembus dinding sel bakteri lebih mudah serta interaksinya dengan reseptor sel bakteri lebih kuat. Selain itu gugus benzoil juga merupakan gugus meruah yang terdapat pada rantai samping amino, sehingga efek halangan ruang gugus meruah tersebut dapat mempengaruhi pengikatan enzim β -laktamase pada cincin β -laktam dan menyebabkan perubahan konformasi sehingga enzim kehilangan aktivitasnya.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan bahwa aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,

Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 lebih besar daripada sefaleksin dan untuk menentukan adanya hubungan antara kadar dengan aktivitas antibakteri dari sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah menentukan kadar Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dengan metode Iodometri. Pada penentuan kadar senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin secara Iodometri terjadi proses hidrolisis senyawa (terurainya cincin β -laktam) dalam suasana alkalis, sehingga iodium yang ditambahkan dapat berinteraksi dengan produk hasil hidrolisis. Perbedaan penggunaan iodium sebelum dan sesudah hidrolisis sebanding dengan jumlah Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin yang cincin β -laktamnya masih utuh. Dari hasil penelitian didapatkan kadar senyawa Sefaleksin rata-rata 99,00 % (b/b) dan kadar senyawa N-benzoilsefaleksin 98,16% (b/b).

Tahap kedua adalah melakukan uji aktivitas antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dengan metode difusi lempeng silinder. Sebagai media pertumbuhan digunakan Agar Antibiotika 1 (A1), dan kadar senyawa dibuat berkisar antara 2000, 1000, 500, 250 dan 125 ppm.

Untuk mengetahui kelinieran dan kemaknaan hubungan antara log kadar senyawa dengan diameter daerah hambatan dilakukan analisis regresi sehingga didapatkan nilai r dan F hitung. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai r dan F hitung lebih besar daripada nilai r dan F hitung tabel berarti ada hubungan yang linier dan bermakna antara kadar larutan uji dengan diameter daerah hambatan.

Untuk mengetahui adakah perbedaan aktivitas senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin maka dilakukan evaluasi nilai b (slope) dengan uji t dua sampel bebas. Dari hasil perhitungan dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 lebih besar daripada Sefaleksin. Sedangkan untuk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 tidak terdapat perbedaan aktivitas antara Sefaleksin dengan N-benzoilsefaleksin.

ABSTRACT

Relation of Rate And Antibacterial Activity of Cephalexin And N-benzoilcephalexin

(Activity Test of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922)

This research was proposed to prove that antibacterial activity of N-benzoilcephalexin against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 are more active than Cephalexin and determine relation between rate and antibacterial activity of Cephalexin and N-benzoilcephalexin. First, rate determination of Cephalexin and N-benzoilcephalexin by Iodometric method. The result got that Cephalexin's concentration was 99,00% (b/b) and N-benzoilcephalexin's concentration was 98,16 % (b/b). Second, antibacterial activity assay of Cephalexin and N-benzoilcephalexin by cylinder plate diffusion method. As growth media is used Antibiotika 1 (A1), and the concentration are made to range from 2000, 1000, 500, 250 and 125 ppm. The result got that there were linear relation between rate and resistance area and antibacterial activity of N-benzoilcephalexin against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 was more active than Cephalexin. While *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 there were same.

Keyword : Cephalexin, N-benzoilcephalexin, Rate determination and Antibacterial activity.

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar	ii
Ringkasan	iv
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xiii
Daftar Lampiran	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Hipotesis	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
1 Tinjauan Tentang Antibiotika β -laktam	8
1.1 Mekanisme Aksi Antibiotika β -laktam	8
1.2 Sefalosporin	11
2 Tinjauan Tentang Sefaleksin	12
2.1 Stabilitas Sefaleksin	13
2.2 Sifat Fisika Kimia Sefaleksin	14
3 Tinjauan Tentang N-benzoilsefaleksin	14
4 Tinjauan Tentang Bakteri	15
4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
4.1.1 Morfologi	15
4.1.2 Biakan	15
4.1.3 Sifat-sifat Pertumbuhan	16
4.1.4 Resistensi	16
4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.2.1 Morfologi	16
4.2.2 Biakan	16

4.2.3 Sifat-sifat Pertumbuhan	16
4.2.4 Resistensi	17
4.3 <i>Escherichia coli</i>	17
4.3.1 Morfologi	17
4.3.2 Biakan	17
4.3.3 Sifat-sifat Pertumbuhan	18
4.3.4 Resistensi	18
5 Penetapan Kadar Sefaleksin	18
5.1 Metode Spektrofotometri Ultra Lembayung	18
5.2 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	18
5.3 Metode Kolorimetri	19
5.4 Metode Iodometri	19
5.5 Metode Yang Terpilih	19
6 Penentuan Aktivitas Mikrobiologis	20
6.1 Metode Dilusi	20
6.2 Metode Difusi	21
6.3 Metode Yang Terpilih	22
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1 Uraian Kerangka Konseptual	23
3.2 Skema Kerangka Konseptual	25
BAB IV METODE PENELITIAN	
1 Rancangan Penelitian	26
2 Bahan	27
2.1 Identifikasi Bakteri	27
2.2 Iodometri	27
2.3 Uji Aktivitas Antibakteri	28
3 Alat	28
4 Pemeriksaan Kualitatif Terhadap Sefaleksin	28
4.1 Pemeriksaan Organoleptis	28
4.2 Pemeriksaan Titik Lebur	28
5 Pemeriksaan Kualitatif Terhadap N-benzoilsefaleksin	29
5.1 Pemeriksaan Organoleptis	29
5.2 Pemeriksaan Titik Lebur	29

6	Penetapan Kadar Larutan Uji Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin secara Iodometri	
6.1	Pembuatan Larutan Baku Primer Kalium Iodat	29
6.2	Pembuatan Larutan Natrium Thiosulfat 0,02 N	29
6.3	Pembuatan Indikator Larutan Kanji	29
6.4	Pembakuan larutan Natrium Thiosulfat Dengan Larutan Baku Primer Kalium Iodat	29
6.5	Pembuatan Larutan Iodium 0,02 N	30
6.6	Pembakuan Larutan Iodium Dengan Natrium Thiosulfat	30
6.7	Pembuatan Larutan NaOH 1,0 N	30
6.8	Pembuatan Larutan Asam Klorida 1,0 N	30
6.9	Pembuatan Larutan Uji Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin	30
6.10	Penetapan Kadar Senyawa Cincin β -Laktam Terurai Dari Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin	31
6.11	Penetapan Kadar Senyawa Cincin β -Laktam Utuh Dan Senyawa Cincin β -Laktam Terurai Dari Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin	31
6.12	Diagram Alur Kerja Penetapan Kadar Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin Dengan Metode Iodometri	32
6.13	Replikasi	32
7	Identifikasi Bakteri	33
7.1	Identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
7.1.1	Pewarnaan Gram	33
7.1.2	Tes Oksidasi	33
7.2	Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	33
7.2.1	Pewarnaan Gram	33
7.2.2	Tes Pada Agar Garam Manitol	34
7.3	Identifikasi <i>Escherichia coli</i>	34
7.3.1	Pewarnaan Gram	34
7.3.2	Tes Indol	34
8	Uji Aktivitas Antibakteri Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin Terhadap Kuman <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	34
8.1	Pembuatan Media Antibiotika 1	34

8.2 Pembuatan Inokulum Kuman	35
8.3 Pembuatan Larutan Uji Antibakteri	35
8.4 Penentuan Aktivitas Antibakteri	36
8.5 Replikasi	36
9 Analisis Data	37
9.1 Rumus Perhitungan Kadar N-Benzoilsafaleksin Dengan Metode Titration Iodometri	37
9.2 Standar Deviasi	37
9.3 Uji Aktivitas	37
BAB V HASIL PENELITIAN	
1. Hasil Identifikasi Senyawa Obat	39
1.1 Hasil Identifikasi Sefaleksin	39
1.2 Hasil Identifikasi N-benzoilsefaleksin	40
2. Hasil Penentuan Kadar	41
2.1 Hasil Penentuan Kadar Senyawa Sefaleksin Dengan Metode Iodometri	41
2.2 Hasil Penentuan Kadar Senyawa N-benzoilsefaleksin Dengan Metode Iodometri	42
3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri (Diameter Daerah Hambatan)	43
3.1 Aktivitas Antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	43
3.2 Aktivitas Antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	46
3.3 Aktivitas Antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	49
BAB VI PEMBAHASAN	52
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	64

DAFTAR TABEL

	Halaman
II.1 Struktur Polimer Dinding Sel Bakteri	8
V.1 Hasil Identifikasi Sefaleksin Secara Organoleptis Dan Jarak Leleh	39
V.2 Hasil Identifikasi N-Benzoilsefaleksin Secara Organoleptis dan Jarak Leleh	40
V.3 Hasil Penentuan Kadar Senyawa Sefaleksin Monohidrat	41
V.4 Hasil Penentuan Kadar Senyawa N-benzoilsefaleksin	42
V.5 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji Sefaleksin Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	43
V.6 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	43
V.7 Perbandingan Diameter Daerah Hambatan Rata-rata Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	44
V.8 Persamaan Garis Antara Log Kadar Larutan Uji Dari Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap Diameter Daerah Hambatan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	45
V.9 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji Sefaleksin Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	46
V.10 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	46
V.11 Perbandingan Diameter Daerah Hambatan Rata-rata Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	47
V.12 Persamaan Garis Antara Log Kadar Larutan Uji Dari Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap Diameter Daerah Hambatan <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	48
V.13 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji Sefaleksin Terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	49
V.14 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	49
V.15 Perbandingan Diameter Daerah Hambatan Rata-rata Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50

V.16 Persamaan Garis Antara Log Kadar Larutan Uji Dari Sefaleksin dan
N-benzoilsefaleksin Terhadap Diameter Daerah Hambatan
Escherichia coli ATCC 25922

51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Dinding Sel Bakteri Gram-Positif Dan Gram-Negatif	10
2.2 Stereokimia Isomer Sefalosporin Alami	12
2.3 Rumus Struktur Sefaleksin Monohidrat	13
2.4 Interaksi β -Laktam Dengan Enzim Transpeptidase	13
2.7 Struktur Kimia N-benzoilsefaleksin	15
3.1 Diagram Alur Kerangka Konseptual	25
4.1 Diagram Alur Rencana Penelitian	26
4.2 Diagram Alur Kerja Penetapan Kadar Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Secara Iodometri	32
4.3 Diagram Alur Kerja Uji Aktivitas Antibakteri	36
5.1 Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap Diameter Daerah Hambatan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	44
5.2 Contoh Hasil Pengamatan Diameter Daerah Hambatan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	45
5.3 Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap Diameter Daerah Hambatan <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	47
5.4 Contoh Hasil Pengamatan Diameter Daerah Hambatan <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	48
5.5 Kurva Hubungan Antara Log Konsentrasi Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin Terhadap Diameter Daerah Hambatan <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50
5.6 Contoh Hasil Pengamatan Diameter Daerah Hambatan <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Contoh Perhitungan Penentuan Kadar Senyawa Sefaleksin Dengan Metode Iodometri	64
2 Contoh Perhitungan Penentuan Kadar Senyawa N-benzoilsefaleksin Dengan Metode Iodometri	65
3 Contoh Perhitungan Kadar Senyawa Pada Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 dan <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	66
4 Nilai r hitung dan F hitung dari Senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin	67
5 Penentuan Persamaan regresi Sefaleksin terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	68
6 Penentuan Persamaan regresi N-benzoilsefaleksin terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	69
7 Penentuan Persamaan regresi Sefaleksin terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	70
8 Penentuan Persamaan regresi N-benzoilsefaleksin terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	71
9 Penentuan Persamaan regresi Sefaleksin terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	72
10 Penentuan Persamaan regresi N-benzoilsefaleksin terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	73
11 Hasil Perhitungan Uji t Variabel b (slope) Senyawa Sefaleksin Dengan Senyawa N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	74
12 Hasil Perhitungan Uji t Variabel b (slope) Senyawa Sefaleksin Dengan Senyawa N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	75
13 Hasil Perhitungan Uji t Variabel b (slope) Senyawa Sefaleksin Dengan Senyawa N-benzoilsefaleksin Terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	76

14	Harga r tabel	77
15	Harga F tabel	78
16	Harga t tabel	79
17	Sertifikat Analisis Sefaleksin	80
18	Sertifikat Analisis N-benzoilsefaleksin	81
19	Surat Keterangan Bakteri Uji	82

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi masih merupakan masalah di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Sampai saat ini antibiotika masih digunakan secara luas untuk pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Untuk menangani kasus infeksi sangat diperlukan antibiotika yang mempunyai efektivitas yang tinggi untuk membunuh bakteri penyebab infeksi. Penggunaan obat antibiotika telah menunjukkan kemajuan dalam upaya penanggulangan penyakit infeksi, tetapi penggunaan antibiotika yang terus menerus dan tidak terarah menyebabkan berbagai masalah. Hal ini disebabkan karena antibiotika dapat menimbulkan efek samping yang merugikan tubuh, apalagi bila penggunaannya dengan dosis yang tidak tepat, sering mengubah kepekaan bakteri terhadap antibiotika yang berakibat bakteri menjadi resisten (Jawetz, 1996; Sasmito, 1996). Oleh karena itu perlu diusahakan dan dikembangkan antibiotika baru untuk mengatasi masalah tersebut diatas. Salah satu proses dalam pengembangan obat baru adalah melakukan modifikasi struktur senyawa yang sudah diketahui aktivitasnya untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi senyawa baru dengan efek yang dikehendaki (Hardjono, 2000).

Golongan antibiotika yang sering digunakan untuk penanggulangan penyakit infeksi adalah golongan β -laktam, yaitu turunan penisilin dan sefalosporin, karena toksisitasnya relatif lebih rendah dibanding antibiotika lain (Hardjono, 2000).

Untuk dapat menimbulkan aktivitas antibakteri, antibiotika golongan penisilin harus mengandung gugus karboksil bebas pada posisi C-3, inti β -laktam yang tergabung dengan cincin tiazolidin dan adanya satu atau lebih gugus amino pada posisi C-6 (Betina, 1983; Hou & Poole, 1971).

Walaupun inti penisilin berperan penting dalam menentukan aktivitas antibakteri, ternyata rantai samping juga cukup berperan dalam menunjang aktivitas. Beberapa modifikasi yang dibuat dengan melakukan variasi struktur rantai samping pada umumnya berpengaruh terhadap spektrum aktivitas antibakteri penisilin (Hardjono, 2000).

Menurut Hou dan Poole (1971) antibiotika penisilin memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi dengan adanya struktur ikatan $-C-CO-NH-$ $-C-CO-N-C-COO-$ yang berkesinambungan, dimulai dari ikatan $-C-CO-NH-$ pada rantai samping dan diteruskan oleh inti β -laktam dan cincin tiazolidin (Hou & Poole, 1971; Betina, 1983).

Dari penelitian Soekardjo (1989) didapatkan bahwa modifikasi struktur turunan N-benzoilampisilin memberikan aktivitas yang lebih besar, baik terhadap *Staphylococcus aureus* 100 (bakteri Gram-positif) maupun *Proteus mirabilis* A3280 (bakteri Gram-negatif).

Aktivitas antibakteri ampisilin sangat terbatas pada beberapa bakteri Gram-negatif, seperti *E. coli*, kebanyakan *Salmonella*, *Shigella* dan *Proteus*, terhadap *P. aeruginosa*, *Serratia*, *Providentia* dan *Citrobacter*, ampisilin tidak menunjukkan aktivitas. Untuk meningkatkan aktivitas terhadap bakteri Gram-negatif telah dilakukan modifikasi pada gugus $-NH_2$ sehingga senyawa menjadi lebih bersifat asam dengan cara asilasi dengan gugus yang kompleks. Turunan asil-N-aminobenzilpenisilin yaitu N-benzoilampisilin ternyata mempunyai aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, suatu bakteri Gram-negatif yang sulit dibasmi, yang lebih besar dibanding senyawa induknya yaitu ampisilin (Soekardjo, 1989).

Keberhasilan ampisilin inilah yang memberikan gagasan untuk melakukan berbagai variasi struktur modifikasi antibiotika golongan sefalosporin untuk mendapatkan sifat-sifat biologik / farmakokinetik yang lebih baik (Hardjono, 2000).

Turunan sefalosporin merupakan antibiotika yang digunakan untuk pengobatan terhadap infeksi bakteri yang resisten terhadap penisilin (Martin, 1982). Struktur turunan sefalosporin mirip dengan turunan penisilin, yang berbeda adalah cincin tiazolidin yang mengikat cincin β -laktam pada penisilin, diganti dengan cincin dihidrotiazin pada sefalosporin (Hardjono, 2000).

Sefalosporin termasuk golongan antibiotika β -laktam yang didapat dari jenis jamur cephalosporium dan dari proses semisintesis. Sumber sefalosporin yang pertama yaitu *Cephalosporium acremonium* yang diisolasi pada tahun 1984 oleh Brotzu dari lepas pantai Sardinia. Filtrat kultur jamur tersebut diketahui dapat

menghambat *Staphylococcus aureus* in vitro dan pengobatan staphylococcal infeksi maupun demam thypoid pada manusia (Gilman *et al.*, 1991).

Sefalosporin dibagi menjadi empat generasi berdasarkan aktivitas antimikrobanya yang secara tidak langsung juga sesuai dengan urutan masa pembuatannya. Sefaleksin merupakan sefalosporin semisintetik dan termasuk generasi pertama (Soekardjo *et al.*, 2000).

Sefaleksin diabsorpsi dengan baik dalam saluran cerna, stabil terhadap asam lambung dan adanya makanan tidak mempengaruhi absorpsi. Lebih dari 90% diekskresi lewat urin dalam bentuk yang tidak berubah sehingga sefaleksin efektif untuk pengobatan infeksi saluran kencing (Gilman *et al.*, 1991). Spektrum aktivitas sefaleksin luas karena efektif terhadap bakteri Gram-positif seperti *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* dan *Pneumococcus sp.*, dan Gram-negatif seperti *E. coli*, *N. gonorrhoea*, *K. pneumonia*, *P. mirabilis* dan *H. influenzae* (Soekardjo *et al.*, 2000).

Potensi sefaleksin sebagai bahan dasar pembuatan obat belum dikembangkan secara optimal. Melihat kemiripan struktur antara sefaleksin dan ampisilin dan mengingat bahwa cincin dihidrotiazin pada sefaleksin lebih stabil dibanding cincin tiazolidin pada ampisilin, maka dilakukan modifikasi struktur sefaleksin dalam usaha mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas antibakteri lebih tinggi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dibanding sefaleksin. Diharapkan dengan mengganti senyawa induk ampisilin dengan sefaleksin, kemudian dilakukan reaksi benzoilasi dengan turunan benzoil klorida dengan substituen bervariasi sesuai modifikasi struktur model Topliss, maka akan diperoleh senyawa baru N-benzoilsefaleksin dengan aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* yang tinggi.

Penambahan gugus benzoil pada sefaleksin diharapkan stabilitasnya terhadap enzim β -laktamase juga meningkat karena gugus benzoil berperan dalam peningkatan lipofilitas bahan obat, yaitu semakin panjang atom C semakin lipofil sehingga bahan obat lebih mudah menembus membran sel bakteri. Gugus benzoil juga berperan dalam meningkatkan keasaman bahan obat sehingga senyawa menjadi lebih stabil dalam bentuk molekul sehingga kemungkinan untuk menembus dinding sel bakteri lebih mudah serta interaksinya dengan reseptor sel bakteri lebih kuat. Selain itu gugus benzoil juga merupakan gugus meruah yang

terdapat pada rantai samping amino, sehingga efek halangan ruang gugus meruah tersebut dapat mempengaruhi pengikatan enzim β -laktamase pada cincin β -laktam dan menyebabkan perubahan konformasi sehingga enzim kehilangan aktivitasnya (Soekardjo *et al.*, 2000).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa N-benzoilsefaleksin ternyata lebih aktif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari pada sefaleksin. Aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin yang lebih tinggi daripada sefaleksin disebabkan karena pemasukan gugus benzoil pada gugus amin primer struktur sefaleksin akan meningkatkan lipofilitas dan sifat elektronik senyawa sehingga akan mempengaruhi proses distribusi penembusan membran dan proses interaksi senyawa dengan reseptor. Peningkatan sifat lipofilik akan meningkatkan penembusan senyawa ke dalam membran biologis sehingga jumlah senyawa yang berinteraksi dengan reseptor menjadi lebih besar, sedang peningkatan sifat elektronik akan mempengaruhi proses penembusan senyawa ke dalam membran biologis, karena sifat elektronik mempengaruhi bentuk molekul senyawa dan memperkuat ikatan senyawa dengan reseptor (Hardjono, 2000; Hakim & Susidarti, 1995). Berdasarkan hal ini, maka dapat dihipotesakan bahwa aktivitas senyawa N-benzoilsafaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* lebih besar daripada sefaleksin. Untuk membuktikan hipotesa tersebut maka dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antibakteri senyawa N-benzoilsefaleksin dan sefaleksin terhadap ketiga bakteri tersebut.

Selama proses sintesis memungkinkan terjadinya pembukaan cincin β -laktam, sehingga penetapan kadar sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin perlu dilakukan karena yang mempunyai aktivitas antibiotik adalah senyawa yang cincin β -laktamnya masih dalam bentuk utuh, belum terurai. Bila sudah terurai maka sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin akan turun aktivitas antibakterinya atau hilang aktivitas antibakterinya (Martin, 1982; Remington's, 1995).

Penurunan kadar antibiotika akan sangat mempengaruhi aktivitas antibakteri. Dalam bidang pengobatan, penurunan kadar antibiotika akan menyebabkan penurunan efek terapi dan meningkatkan kemungkinan terjadinya resistensi kuman terhadap sefaleksin. Berdasarkan bahwa besarnya aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh besarnya kadar sehingga dapat dihipotesakan bahwa

ada hubungan yang linier antara kadar dengan aktivitas antibakteri dari sefalekslin dan N-benzoilsefalekslin. Untuk membuktikan hipotesa tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan penetapan kadar dan uji aktivitas antibakteri sefalekslin dan N-benzoilsefalekslin, sehingga dapat diketahui apakah ada hubungan antara kadar dengan aktivitas antibakteri.

Dengan adanya penurunan kadar senyawa antibiotika, maka dipandang perlu untuk dilakukan analisis secara kuantitatif terhadap kadar sefalekslin dan N-benzoilsefalekslin. Metode analisis tersebut harus dapat menunjukkan senyawa yang cincin β -laktamnya masih dalam bentuk utuh dalam kadar tersebut. Telah dikembangkan berbagai metode penetapan kadar baik secara mikrobiologi maupun secara kimia. Umumnya penetapan kadar secara kimia lebih cepat daripada metode mikrobiologi, karena pada metode mikrobiologi untuk membiakkan dan pengukurannya memerlukan waktu yang lebih lama. Tetapi metode mikrobiologi mempunyai keunggulan dalam hal lebih peka dan mampu meniadakan kesalahan hasil pada bentuk senyawa hasil peruraian (Pelczar *et al.*, 1986). Berdasarkan Farmakope Amerika XXV, 2002, uji mikrobiologi tetap merupakan standar untuk pengukuran aktivitas antibakteri.

Penetapan kadar sefalekslin secara kimia harus melalui metode yang dapat memisahkan senyawa yang cincin β -laktamnya masih dalam bentuk utuh dengan senyawa yang cincin β -laktamnya sudah tidak utuh sehingga dapat menentukan besarnya kadar sefalekslin dan N-benzoilsefalekslin yang mempunyai aktivitas antibakteri.

Penetapan kadar sefalekslin dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri, metode titrasi volumetrik (iodometri), kromatografi lapis tipis, kromatografi cair kinerja tinggi dan kolorimetri (Yamana & Tsuji, 1976; Sykes & Brush, 1995).

Sesuai dengan Farmakope Indonesia III, 1979, metode iodometri merupakan metode terpilih untuk penetapan kadar sefalekslin. Metode iodometri ini dapat menetapkan bagian β -laktam dari sefalekslin. Pengaruh pH, suhu atau enzim β -laktamase dapat menyebabkan rusaknya cincin β -laktam sefalekslin. Molekul sefalekslin yang cincin β -laktamnya sudah tidak utuh akan mengkonsumsi iodium. Sedangkan molekul sefalekslin yang cincin β -laktamnya masih dalam bentuk utuh tidak mengkonsumsi iodium. Dengan demikian metode iodometri sesuai untuk

menetapkan senyawa sefaleksin aktif maupun tidak aktif (Marrelli, 1975; Yamana & Tsuji, 1976; Sykes & Brush, 1995).

Penetapan kadar sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin melalui metode iodometri ini dinyatakan dalam persen berat per berat. Kadar sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin yang telah diketahui akan dilakukan pengenceran untuk dilakukan uji mikrobiologi dan mengetahui adanya hubungan antara kadar dengan aktivitas terhadap bakteri.

Penentuan aktivitas mikrobiologi sefaleksin dapat ditentukan dengan metode difusi yang dinyatakan dalam diameter daerah hambatan. Keuntungan metode difusi adalah, sensitif, relatif lebih ekonomis, rentang konsentrasi zat uji dapat lebih lebar dibanding metode dilusi (Barnett, 1997; Lorian, 1982).

Uji aktivitas sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dilakukan terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif, yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram-negatif yang paling sulit dimatikan, *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri Gram-positif yang peka terhadap sefaleksin dan *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram-negatif yang banyak digunakan di laboratorium pada penelitian aktivitas secara mikrobiologi.

Pada penelitian ini diharapkan akan terlihat adanya hubungan antara kadar senyawa aktif sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dan adanya perbedaan aktivitas antibakteri dari N-benzoilsefaleksin dengan sefaleksin dengan diameter daerah hambatan kuman *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Diameter daerah hambatan yang besar menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi dari sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

- (1) Apakah aktivitas antibakteri senyawa N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 lebih besar daripada sefaleksin
- (2) Apakah ada hubungan yang linier antara kadar dengan aktivitas antibakteri dari sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui hubungan antara kadar dengan aktivitas antibakteri sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.3.2 Tujuan Khusus

- (1) Untuk membandingkan aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin dengan sefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.
- (2) Untuk menentukan adanya hubungan yang linier antara kadar dengan aktivitas antibakteri dari sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

1.4 Hipotesis

- (1) Aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 lebih besar daripada sefaleksin.
- (2) Ada hubungan yang linier antara kadar dengan aktivitas antibakteri dari sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

1.5 Manfaat Penelitian

- (1) Mengetahui aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dibandingkan dengan sefaleksin.
- (2) Mengetahui hubungan kadar sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin yang ditetapkan dengan metode iodometri dan aktivitas antibakterinya terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang ditetapkan melalui diameter daerah hambatan.
- (3) Diharapkan penelitian ini dapat memberikan sumbangan informasi untuk perkembangan antibiotika turunan sefaleksin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1 Tinjauan Tentang Antibiotika β -Laktam

Antibiotika yang strukturnya mengandung cincin β -laktam banyak dikembangkan untuk pengobatan infeksi bakteri. Antibiotika β -laktam dibagi menjadi tiga kelompok yaitu turunan penisilin, sefalosporin dan β -laktam non klasik (Soekardjo *et al.*, 2000). Golongan sefalosporin mempunyai struktur inti gabungan cincin β -laktam dengan cincin dihidrothiazin yang beranggota 6 (Molavi, 1990). Turunan sefalosporin digunakan untuk pengobatan infeksi oleh bakteri yang telah tahan terhadap penisilin, terutama *staphylococci* yang menghasilkan penisilinase (Soekardjo *et al.*, 2000).

1.1 Mekanisme Aksi Antibiotika β -laktam

Dinding sel bakteri adalah struktur yang kompleks dan berfungsi terutama sebagai selubung untuk melindungi protoplasma dan memberikan bentuk karakteristik bakteri. Komposisi struktur polimer dinding sel bakteri Gram-positif berbeda dengan bakteri Gram-negatif.

Tabel I.1 Struktur polimer dinding sel bakteri

Polimer	Gram-positif	Gram-negatif
Peptidoglikan ^a	50-100 lapis	1-2 lapis
Asam teikoat ^a	+	-
Asam teikuronat ^a	+	-
Lipopolisakarida ^a	-	+
Lipoprotein	-	+
Fosfolipid	-	+
Protein	+/-	+
Polisakarida	+/-	-

Keterangan :

^a : makromolekul yang hanya didapatkan pada prokariotik (Soekardjo *et al.*, 2000)

Peptidoglikan merupakan makromolekul penting untuk kehidupan bakteri, yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Peptidoglikan mempunyai peranan penting dalam memelihara keutuhan dinding sel dan bentuk sel karena mempunyai kisi-kisi struktur melintang dan berhubungan sangat erat.

Penghambatan biosintesis 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 bersama-sama melalui rantai cabang peptida pendek. Rantai glikan mengandung residu yang dapat dipergantikan yaitu N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat. Residu muramil diganti dengan rantai peptida yang mengandung residu pengganti, yaitu L dan D asam-asam amino. Rangkaian asam amino dari salah satu peptida adalah L-alanin-D-asam glutamat-L-alanin-D-alanin.

Kemiripan antara bagian struktur penisilin dan sefalosporin dengan bagian tertentu dari asam N-asetil muramat, D-alanil-D-alanin dan L-alanil-D-asam glutamat, sering digunakan untuk menjelaskan mekanisme kerja antibiotika β -laktam. Tahap akhir sintesis dinding sel bakteri adalah reaksi hubungan melintang (*cross linking*) antar unit-unit peptidoglikan nasen dengan katalisator enzim transpeptidase.

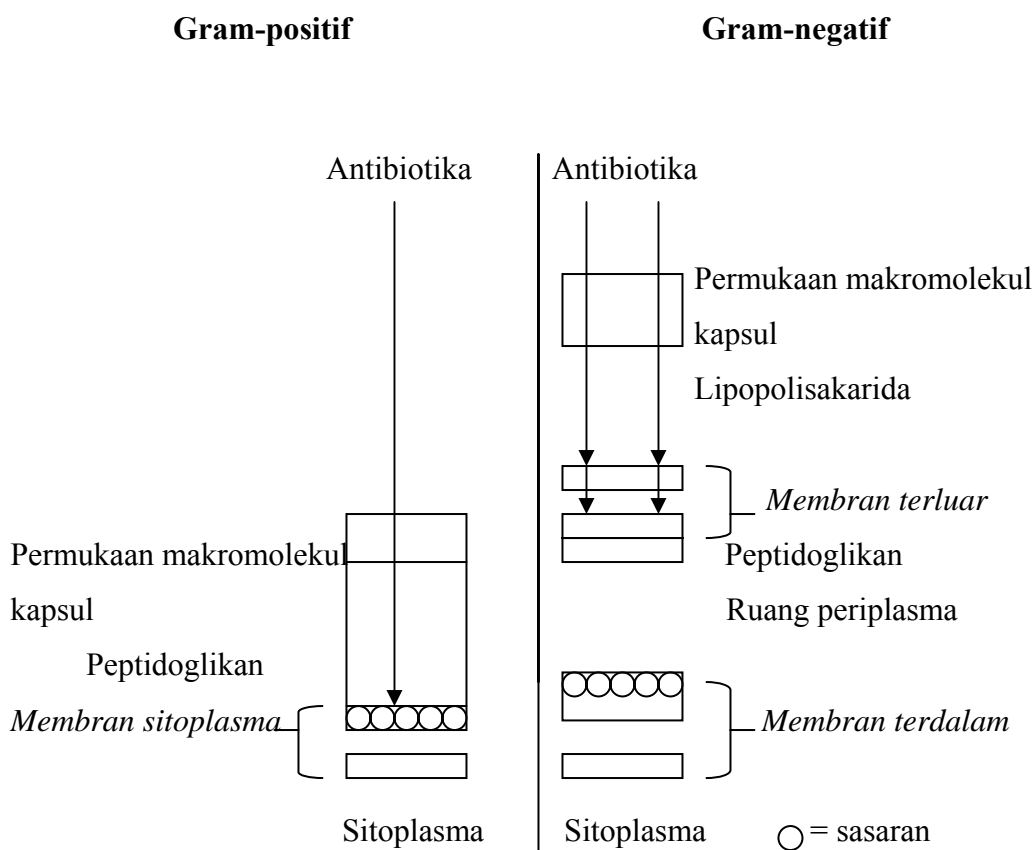
Karena turunan penisilin dan sefalosporin mempunyai bagian struktur yang mirip dengan gugus ujung D-alanil-D-alanin dari bagian pentapeptida unit peptidoglikan nasen, maka kedua turunan tersebut dapat menghambat kerja enzim transpeptidase dengan cara mengikat enzim, melalui ikatan kovalen, sehingga mencegah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

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

Antibiotika β -laktam hanya dapat membunuh bakteri pada fasa pertumbuhan dan tidak dapat mempengaruhi bakteri yang dalam bentuk tidak

aktif atau persisten. Ini merupakan alasan mengapa pemberian penisilin, suatu bakterisid, bersama-sama dengan senyawa bakteriostatik, seperti turunan amfenikol, sulfonamida atau tetrasiklin menjadi tidak rasional. Karena sel mamalia tidak mempunyai dinding, antibiotika β -laktam dan antibiotika lain yang menghambat biosintesis dinding sel bakteri bersifat sangat khas dan mempunyai toksisitas yang selektif terhadap sel bakteri.

Dinding sel bakteri gram Gram-positif berbeda dengan bakteri Gram-negatif dan hal ini dapat menjelaskan mengapa banyak turunan β -laktam yang tidak sensitif terhadap bakteri Gram-negatif. Perbedaan komposisi dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Membran terluar bakteri Gram-negatif dapat menghalangi penembusan antibiotika β -laktam pada sasaran, sedang pada bakteri Gram-positif tidak ada (Soekardjo *et al.*, 2000).

Untuk menunjukkan kerja pada bakteri Gram-negatif, seperti *E. coli* atau *P. aeruginosa*, antibiotika β -laktam pertama-tama harus menembus membran terluar selubung bakteri secara difusi pasif melalui saluran yang terbentuk oleh pori protein. Sesudah menembus membran terluar, antibiotika β -laktam 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 antibiotika β -laktam.

Efek antibiotika β -laktam terhadap bakteri adalah :

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

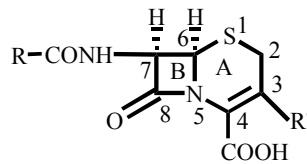
β -Laktamase adalah enzim yang dapat menginaktifkan antibiotika β -laktam. Pada bakteri Gram-negatif, enzim β -laktamase terdapat pada ruang periplasma, suatu posisi yang strategis karena harus dapat dilewati oleh antibiotika β -laktam sebelum mencapai sasaran. Pada bakteri Gram-positif, enzim tersebut dilepaskan ke dalam medium dan merusak antibiotika β -laktam sebelum mencapai sel.

Penghambat β -laktamase adalah senyawa yang dapat menetralkan enzim β -laktamase sehingga mencegah penginaktifan antibiotika β -laktam dan tanpa halangan dapat secara bebas menunjukkan kerja bakterisidnya. Karena efek sinergis tersebut, penghambat β -laktamase sering digunakan bersama-sama dengan antibiotika β -laktam untuk mengatasi infeksi bakteri yang telah tahan. Contoh penghambat β -laktamase : asam klavulanat, asam olivanat, sulbaktam dan pivsulbaktam (Soekardjo *et al.*, 2000).

1.2 Sefalosporin

Pada awalnya, turunan sefalosporin didapatkan sebagai hasil isolasi ekstrak jamur *Cephalosporium acremonium*. Dari jamur ini dapat diisolasi tiga antibiotika, diantaranya adalah sefalosporin C. dari senyawa inilah kemudian dilakukan modifikasi molekul untuk mendapatkan turunan sefalosporin yang digunakan sekarang ini.

Turunan sefalosporin adalah antibiotika β -laktam, mempunyai dasar struktur mirip dengan penisilin, yaitu cincin β -laktam-dihidrotiazin (sefem), mengandung dua pusat atom asimetrik (C6 dan C7) (Soekardjo *et al.*, 2000).



Sefalosporin

Keterangan : (A) Cincin dihidrotiazin
(B) Cincin β -laktam

Gambar 2.2 Struktur inti sefalosporin (McEvoy, 2002).

2 Tinjauan Tentang Sefaleksin

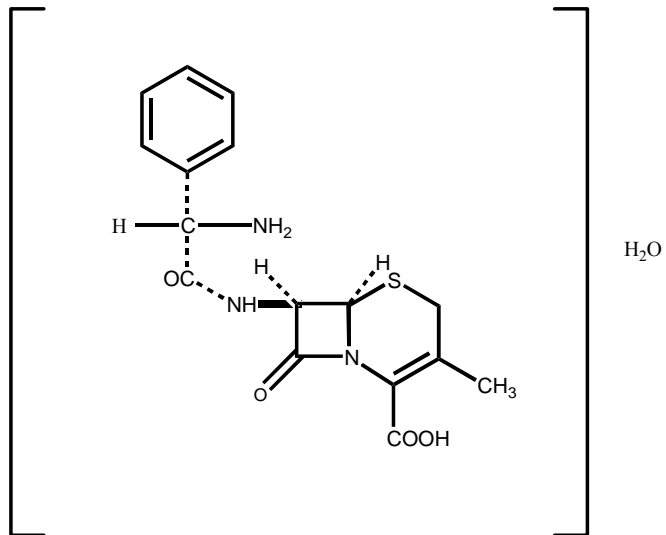
Sefaleksin merupakan suatu senyawa semisintetik dari generasi pertama sefalosporin. Nama kimia sefaleksin :

- Asam(6R,7R)-7-[(R)-2-amino-2-fenilasetamido]-3-metil-8-okso-5-tia-1-azabisiklo[4,2,0]okt-2-ena-2-karboksilat monohidrat (Anonim, 1995).
- (7R)-3-methyl-7-(α -D-phenylglycylamino)-3-cephem-4-carboxylicacid monohidrat (Parfitt, 1999).
- 7- α -(D-amino- α -phenylacetamido)-3-methyl-cephem-carboxylicacid (Martin, 1982).

Rumus kimia : Anhidrat = $C_{16}H_{17}N_3O_4S$

Monohidrat = $C_{16}H_{17}N_3O_4S.H_2O$ (Anonim, 1995)

Rumus struktur :

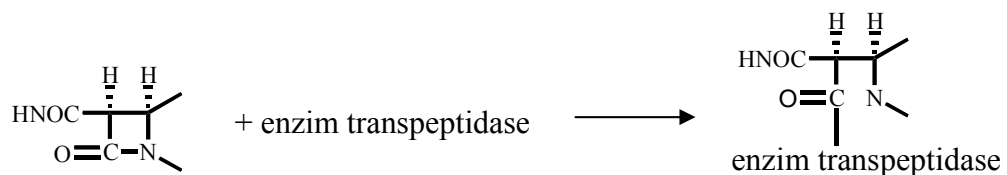


Gambar 2.3 Rumus struktur sefaleksin monohidrat (Anonim, 1995).

2.1 Stabilitas Sefaleksin

Stabilitas larutan sefaleksin tergantung pada pH, degradasi cepat terjadi dalam media basa dan akan tetap stabil dalam kondisi agak asam. Adanya gugus aminobenzil menyebabkan sefaleksin relatif tahan terhadap asam sehingga penggunaan peroral dapat diabsorpsi dengan baik. Selain itu degradasi sefaleksin juga dapat disebabkan oleh adanya panas, asam kuat dan sinar UV (260 nm). Reduksi gugus asetoksi sefalosporin menyebabkan sefaleksin 25 x lebih stabil terhadap asam dibanding sefalosporin lain (Marrelli, 1975; Yamana & Tsuji, 1976; Martin, 1982).

Interaksi β -laktam dengan enzim β -laktamase atau sefalosporinase menyebabkan sefaleksin tidak dapat berinteraksi dengan enzim transpeptidase dari mikroorganisme sehingga sefaleksin tidak aktif lagi.



Gambar 2.4 Interaksi β -laktam dengan enzim transpeptidase (Soekardjo *et al.*, 2000).

Pada rentang pH 3-5 aktivitas sefaleksin tidak hilang dalam 72 jam, 25°C. Kecepatan degradasi dijumpai pada pH 6 dan pH 7 (25°C) yaitu sekitar 3 % dan 18 % per hari. Menurut Farmakope Amerika, 2002, dapar asam klorida (pH 2) menurunkan aktivitas sefaleksin 5 % dan dapar fosfat (pH 6,5) menurunkan aktivitas sebanyak 45 % dalam 24 jam suhu 37°C.

2.1.2 Sifat Fisika Kimia Sefaleksin

Pemerian : Serbuk hablur berwarna putih sampai putih kuning gading, berbau khas.

BM : 347,40 (anhidrat)
365,40 (monohidrat)

Kelarutan : Larut dalam air (1:100), praktis tidak larut dalam etanol (95 %) P, dalam eter P dan dalam kloroform P (Anonim, 1995).

Jarak leleh : 189°C – 192°C (Hardjono, 2000).

Larutan 0,5 % sefaleksin dalam air mempunyai pH 4,0-5,5 (Parfitt, 1999).

5 % suspensi sefaleksin dalam air mempunyai pH 3,0-5,5 (Anonim, 2002).

Konstanta Disosiasi : Dalam 66 % dimetilformamid pKa = 5,2 (karboksil grup) dan 7,3 (amina grup) (Lund, 1994).

Sefaleksin dikenal dalam bentuk sefaleksin anhidrat, monohidrat (Anonim, 1995). Larutan sefaleksin dalam air mengkristal pada suhu kamar sebagai dihidrat, tetapi menjadi monohidrat jika kelembaban relatif dibawah 70 % (Anonim, 1989).

Sefaleksin diabsorpsi dengan baik dalam saluran cerna, stabil terhadap asam lambung dan adanya makanan tidak mempengaruhi absorpsi, hanya memperlambat tercapainya kadar puncak. Ekskresinya sekitar 90 % melalui urin dalam bentuk tidak berubah sehingga sefaleksin efektif untuk pengobatan infeksi saluran kencing (Gilman *et al.*, 1991; Anonim 1995).

Konsentrasi Hambat Minimal Sefaleksin terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah 250 µg/ml (Hardjono, 2000).

3 Tinjauan Tentang N-benzoilsefaleksin (Hardjono, 2000)

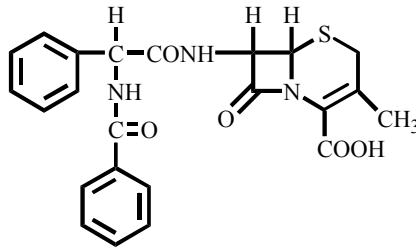
Pemerian : bentuk amorf, warna putih tulang, bau khas

Kelarutan : larut dalam methanol, etanol, aseton, kloroform dan dimetilsulfoksida (DMSO)

BM : 461,40

Jarak leleh : 190°C – 192°C

Konsentrasi Hambat Minimal terhadap *Pseudomonas aeruginosa* : 125 µg/ml



Gambar 2.5 Struktur kimia N-benzoilsefaleksin (Hardjono, 2000).

4 Tinjauan Tentang Bakteri

4.1 *Pseudomonas aeruginosa* (Jawetz *et al.*, 1996)

Pseudomonas aeruginosa sering terdapat dalam jumlah kecil dalam flora normal usus. Kuman ini ditemukan juga pada kulit manusia. Kuman ini banyak juga terdapat dalam tanah, air, sampah dan udara. Spesies *Pseudomonas* lainnya terdapat dalam lingkungan basah tetapi jarang menyebabkan penyakit.

4.1.1 Morfologi

Pseudomonas aeruginosa adalah organisme berbentuk batang dengan panjang bervariasi antara 2-4 µm. Merupakan gram negatif, motil dan dapat berupa bakteri tunggal, berpasangan atau kadang-kadang berbentuk rantai pendek.

4.1.2 Biakan

Pseudomonas aeruginosa merupakan aerob obligat, dapat tumbuh cepat dalam berbagai macam media perbenihan, kadang-kadang menghasilkan bau aromatis yang enak. Beberapa strain menghemolisa darah. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni bulat halus dengan warna berfluoresensi kehijau-hijauan.

4.1.3 Sifat-sifat Pertumbuhan

Pseudomonas aeruginosa tumbuh baik pada temperatur 37°C-42°C. Pertumbuhannya pada temperatur 42°C membantu membedakannya dari spesies *Pseudomonas* lainnya yang hanya dapat tumbuh dengan baik pada suhu rendah.

4.1.4 Resistensi

Pseudomonas aeruginosa akan mati pada pemanasan pada suhu 55°C selama satu jam tetapi paling tahan terhadap desinfektan biasa dibanding dengan batang gram negatif lainnya. *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap penisilin dan beberapa antibiotik spektrum luas.

4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram-positif dan bersifat fakultatif anaerob (Jawetz *et al.*, 1996).

4.2.1 Morfologi

Staphylococcus aureus adalah sel berbentuk bola dengan diameter $\pm 1\mu\text{m}$, biasanya tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur. Pada biakan cair terlihat kokus tunggal, berpasangan, tetrad atau berbentuk rantai. Kokus muda bersifat Gram-positif kuat, pada biakan tua banyak sel menjadi Gram-negatif. *Staphylococcus* tidak bergerak dan tidak menghasilkan spora (Rawlins, 1988; Jawetz *et al.*, 1996).

4.2.2 Biakan

Staphylococcus mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan bakteriologi dalam keadaan aerobik atau mikroaerobik. Pertumbuhan paling cepat terjadi pada temperatur 37°C tetapi pigmen terbentuk paling baik pada temperatur kamar (20°C). Pada perbenihan padat koloni bulat, menonjol, halus dan berkilauan membentuk pigmen berwarna kuning emas. Dalam lempeng agar darah, koloni menjadi besar dan menunjukkan daerah hemolisis (Jawetz *et al.*, 1996).

4.2.3 Sifat-sifat Pertumbuhan

Staphylococcus dapat meragi banyak karbohidrat dengan lambat menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik

bervariasi tetapi enzim katalase dihasilkan secara tetap. *Staphylococcus* relatif resisten terhadap pengeringan, terhadap panas (kuman tahan 50°C selama 30 menit) dan terhadap 9 % natrium klorida tetapi dihambat oleh heksaklorofen 3 %.

4.2.4 Resistensi

Resistensi kuman *Staphylococcus aureus* terhadap sefaleksin disebabkan oleh enzim β -laktamase. Enzim ini mengkatalisir pembukaan cincin β -laktam sehingga sefaleksin tidak aktif lagi. Pada bakteri Gram-positif, produk β -laktamase akan diekskresi secara ekstraseluler. Pada bakteri Gram-negatif, produk β -laktamase akan diekskresi pada ruang periplasma. Ruang periplasma adalah ruang antara peptidoglikan yang mengelilingi membran sitoplasma dengan membran luar yang sangat hidrofobik. Letak β -laktamase ini akan lebih melindungi bakteri Gram-negatif (Gilman *et al.*, 1991; Smith, 1988).

4.3 *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* termasuk dalam familia Enterobacteriaceae yang merupakan flora normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Meskipun diduga non patogen, dari beberapa penelitian diduga *Escherichia coli* bertanggung jawab terhadap terjadinya beberapa kasus diare berat sampai ringan dan infeksi saluran kemih (Jawetz *et al.*, 1996). Pada penggolongan dengan pewarnaan, bakteri *Escherichia coli* termasuk Gram-negatif.

4.3.1 Morfologi

Escherichia coli berbentuk batang dengan lebar 0,4-0,7 μm dan panjang 1-4 μm , dapat membentuk rantai, tidak membentuk spora, tetapi hanya sebagian kecil yang membentuk kapsul. Bakteri ini termasuk Gram-negatif yang bersifat aerob (Jawetz *et al.*, 1996).

4.3.2 Biakan

Bakteri ini dapat tumbuh dengan cepat selama 24 jam dan pada suhu 20-40°C. *Escherichia coli* dapat tumbuh pada garam-garam organik, garam-garam ammonium dan glukosa. Pada media agar plate, selama 12-24 jam sudah memperlihatkan permukaan koloni dengan diameter 2-3 mm, berbentuk bulat

konveks halus dengan tepi yang nyata. Bakteri ini mati pada suhu 60°C dengan pemanasan selama 30 menit, namun ada beberapa jalur yang memerlukan suhu lebih tinggi (Jawetz *et al.*, 1996).

4.3.3 Sifat Pertumbuhan

Escherichia coli memecah banyak karbohidrat dengan membentuk asam dan gas. Asam yang terutama adalah asam laktat dan sedikit asam format, asam asetat dan etanol. Menghasilkan indol, tidak menggunakan sitrat, tumbuhan pada KCN, memecah urea dan mencairkan gelatin.

4.3.4 Resistensi

Resistensi bakteri ini terhadap antibiotika sefalekssin disebabkan oleh sebagian enzim β -laktamase yang dihasilkan. *Escherichia coli* juga dapat menghasilkan enzim amidase yang mampu memecah ikatan amida rantai samping tentang *Staphylococcus aureus* pada senyawa penisilin (Nogrady, 1992).

5 Penetapan Kadar Sefalekssin

5.1 Metode Spektrofotometri Ultra Lembayung

Prinsipnya yaitu sefalekssin memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 262 nm sehubungan dengan adanya gugus kromofor ($O=CNC=C-$). Tidak adanya serapan pada panjang gelombang tersebut menunjukkan pembukaan cincin β -laktam (Marrelli, 1975; Yamana & Tsuji, 1976).

5.2 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Metode ini digunakan untuk mempelajari kinetika degradasi beberapa sefalosporin. Untuk sefalekssin digunakan resin penukar ion sebagai fase diam dan larutan natrium difosfat 0,02 N yang diatur pHnya sampai pH 8,5 dengan natrium hidroksida sebagai fase gerak. Metode ini jika dibandingkan dengan metode kromatografi lapisan tipis menunjukkan hasil yang serupa (Yamana & Tsuji, 1976).

5.3 Metode Kolorimetri

Dasar reaksi metode ini ialah bahwa hidroksilamin memutuskan cincin β -laktam (pH 7,0) untuk membentuk asam hidroksamat yang akan berikatan dengan ion ferri membentuk kompleks berwarna (Marrelli, 1975; Yamana & Tsuji, 1976).

5.4 Metode Iodometri

Metode ini berdasarkan fakta bahwa molekul sefaleksin yang utuh tidak mengkonsumsi iodium tetapi sebaliknya pada hasil hidrolisis alkali dari sefaleksin. Hidrolisis alkali menyebabkan pemutusan cincin β -laktam. Variasi waktu hidrolisis, temperatur, pH larutan iodium dan konsentrasi sefaleksin mempengaruhi konsumsi iodium (Marrelli, 1975; Anonim, 1979; Yamana & Tsuji, 1976).

5.5 Metode Yang Terpilih

Berdasarkan Farmakope Indonesia edisi III, 1979, metode terpilih untuk penetapan kadar senyawa aktif sefaleksin secara kimia adalah metode iodometri. Pada metode ini sefaleksin dihidrolisis dengan penambah natrium hidroksida dan didiamkan selama 20 menit. Kemudian ditambahkan kedalamnya suatu larutan dapar asetat dan diasamkan dengan asam klorida, ditambah iodium dan didiamkan 20 menit. Kelebihan iodium yang terjadi dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat standar. Sebagai blanko digunakan sefaleksin yang langsung ditambah larutan dapar dan iodium. Kelebihan iodium dititrasi dengan larutan natrium 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 (Kolthoff & Sandell, 1952; Basset *et al.*, 1978) :

(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.

(2) Pengaruh penguapan iodium

Iodium dalam larutan akan mudah menguap dengan naiknya temperatur. Penguapan iodium dapat diabaikan jika titrasi dilakukan pada temperatur kamar dan dengan penambahan kalium iodida sebanyak 4%, disimpan dalam wadah tertutup rapat yang mampu mengurangi pengaruh cahaya.

6 Penentuan Aktivitas Mikrobiologis

Penentuan kadar secara mikrobiologi mempunyai keuntungan dalam hal lebih peka dan mampu meniadakan hasil pada bentuk senyawa hasil peruraian (McEvoy, 2002). Selain itu adanya penurunan aktivitas antimikroba tidak ditunjukkan oleh metode kimia (Anonim, 2002).

Uji aktivitas antimikroba dilakukan berdasarkan kemampuan membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme hidup. Keberhasilan uji aktivitas tidak hanya ditentukan oleh jenis antibiotika, tetapi spesifikasi kuman juga sangat menentukan. Kuman yang resistensi terhadap antibiotika akan menimbulkan hasil penentuan aktivitas antimikroba antibiotika (Pelczar, 1986).

Berbagai metode penentuan aktivitas mikrobiologis adalah sebagai berikut :

6.1 Metode Dilusi

Prinsip metode dilusi adalah suatu seri pengenceran larutan antibiotika dalam media pertumbuhan, mulai dari konsentrasi tinggi sampai rendah. Kuman ditanam dalam jumlah tertentu. Setelah inkubasi akan nampak hambatan pertumbuhan. Metode dilusi ini dapat menentukan konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bakterisid minimum (Lim,1998).

Berdasarkan media yang digunakan, metode dilusi ini dibedakan menjadi :

- Metode dilusi cair

Suatu seri tabung berisi media cair, masing-masing tabung mengandung antibiotika dengan konsentrasi berbeda. Isolat kuman ditanamkan ke dalam setiap tabung dan dikontrol dengan tepat. 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 difusi padat

Suatu seri lempeng berisi agar, masing-masing berisi antibiotika dengan konsentrasi berbeda. Isolat bakteri kemudian ditanam dalam lempeng agar. Setelah inkubasi akan terlihat kadar hambatan minimal (Lorian, 1982; Lim, 1998).

6.2 Metode Difusi

Metode ini berdasarkan difusi antibiotika dari pencadang ke dalam media yang telah ditanam kuman uji. Setelah inkubasi akan nampak daerah jernih di sekeliling pencadang dan daerah keruh mengelilingi daerah jernih tersebut. Daerah jernih ini disebut diameter daerah hambatan dimana terjadi hambatan pertumbuhan kuman. Diameter daerah hambatan ini sebanding dengan konsentrasi antibiotika dalam pencadang. Diameter daerah hambatan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu (Lorian, 1982; Jawetz *et al.*, 1996) :

- Komposisi dan pH kandungan kimia
- Temperatur dan waktu inkubasi
- Ketebalan media dalam lempeng
- Laju difusi antibiotika melawan laju pertumbuhan kuman
- Ukuran inokulum

Berdasar pencadang yang digunakan, metode ini juga dibedakan menjadi (Lorian, 1982; Jawetz *et al.*, 1996) :

- Metode difusi cakram

Metode ini menggunakan kertas yang dijenuhkan dengan antibiotika sebagai pencadang dan diletakkan pada permukaan agar. Pada metode ini kandungan antibiotika tidak dapat diprediksi dengan tepat karena variabilitas produk kertas.

- Metode difusi sekunder

Pada metode ini sebagai pencadang digunakan silinder logam atau gelas berisi larutan antibiotika kadar tertentu. Jumlah larutan antibiotika dapat diatur agar ketersediaan antibiotika selama inkubasi tetap terjamin.

- Metode difusi cetak lubang

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

6.3 Metode Yang Terpilih

Menurut Farmakope Amerika XXV, 2002, untuk menentukan aktivitas mikrobiologis sefaleksin adalah metode difusi silinder logam. Keuntungan metode difusi silinder logam adalah penggunaan relatif lebih ekonomis, sederhana, fleksibel dan rentang konsentrasi larutan antibiotika lebih luas dibanding metode dilusi, cukup teliti dan reliabilitas tinggi untuk teknik in vitro (Lorian, 1982; Barnett, 1997; Prescott, 2002).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Uraian Kerangka Konseptual

Golongan antibiotika yang sering digunakan untuk penanggulangan penyakit infeksi adalah golongan β -laktam, yaitu turunan penisilin dan sefalosporin, karena toksisitasnya relatif lebih rendah dibanding antibiotika lain (Hardjono, 2000).

Untuk dapat menimbulkan aktivitas antibakteri, antibiotika golongan penisilin harus mengandung gugus karboksil bebas pada posisi C-3, inti β -laktam yang tergabung dengan cincin tiazolidin dan adanya satu atau lebih gugus amino pada posisi C-6 (Betina, 1983; Hou & Poole, 1971).

Walaupun inti penisilin berperan penting dalam menentukan aktivitas antibakteri, ternyata rantai samping juga cukup berperan dalam menunjang aktivitas. Beberapa modifikasi yang dibuat dengan melakukan variasi struktur rantai samping pada umumnya berpengaruh terhadap spektrum aktivitas antibakteri penisilin (Hardjono, 2000).

Dari penelitian Soekardjo (1989) dapat diketahui bahwa modifikasi struktur turunan N-benzoilampisilin memberikan aktivitas yang lebih besar, baik terhadap *Staphylococcus aureus* 100 (bakteri Gram-positif) maupun *Proteus mirabilis* A3280 (bakteri Gram-negatif).

Keberhasilan ampisilin inilah yang memberikan gagasan untuk melakukan berbagai variasi struktur modifikasi antibiotika golongan sefalosporin untuk mendapatkan sifat-sifat biologik / farmakokinetik yang lebih baik (Hardjono, 2000).

Turunan sefalosporin merupakan antibiotika yang digunakan untuk pengobatan terhadap infeksi bakteri yang resisten terhadap penisilin (Martin, 1982). Struktur turunan sefalosporin mirip dengan turunan penisilin, yang berbeda adalah cincin tiazolidin yang mengikat cincin β -laktam pada penisilin, diganti dengan cincin dihidrotiazin pada sefalosporin (Hardjono, 2000).

Potensi sefaleksin sebagai bahan dasar pembuatan obat belum dikembangkan secara optimal. Melihat kemiripan struktur antara sefaleksin dan ampisilin dan mengingat bahwa cincin dihidrotiazin pada sefaleksin lebih stabil

dibanding cincin tiazolidin pada ampicilin, maka dilakukan modifikasi struktur sefaleksin dalam usaha mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas antibakteri lebih tinggi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dibanding sefaleksin.

Penambahan gugus benzoil pada sefaleksin diharapkan stabilitasnya terhadap enzim β -laktamase juga meningkat karena gugus benzoil berperan dalam peningkatan lipofilitas bahan obat, yaitu semakin panjang atom C semakin lipofil sehingga bahan obat lebih mudah menembus membran sel bakteri. Gugus benzoil juga berperan dalam meningkatkan keasaman bahan obat sehingga senyawa menjadi lebih stabil dalam bentuk molekul sehingga kemungkinan untuk menembus dinding sel bakteri lebih mudah serta interaksinya dengan reseptor sel bakteri lebih kuat. Selain itu gugus benzoil juga merupakan gugus meruah yang terdapat pada rantai samping amino, sehingga efek halangan ruang gugus meruah tersebut dapat mempengaruhi pengikatan enzim β -laktamase pada cincin β -laktam dan menyebabkan perubahan konformasi sehingga enzim kehilangan aktivitasnya (Soekardjo *et al.*, 2000). Berdasarkan hal ini, maka dapat dihipotesakan bahwa aktivitas senyawa N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* lebih besar daripada sefaleksin.

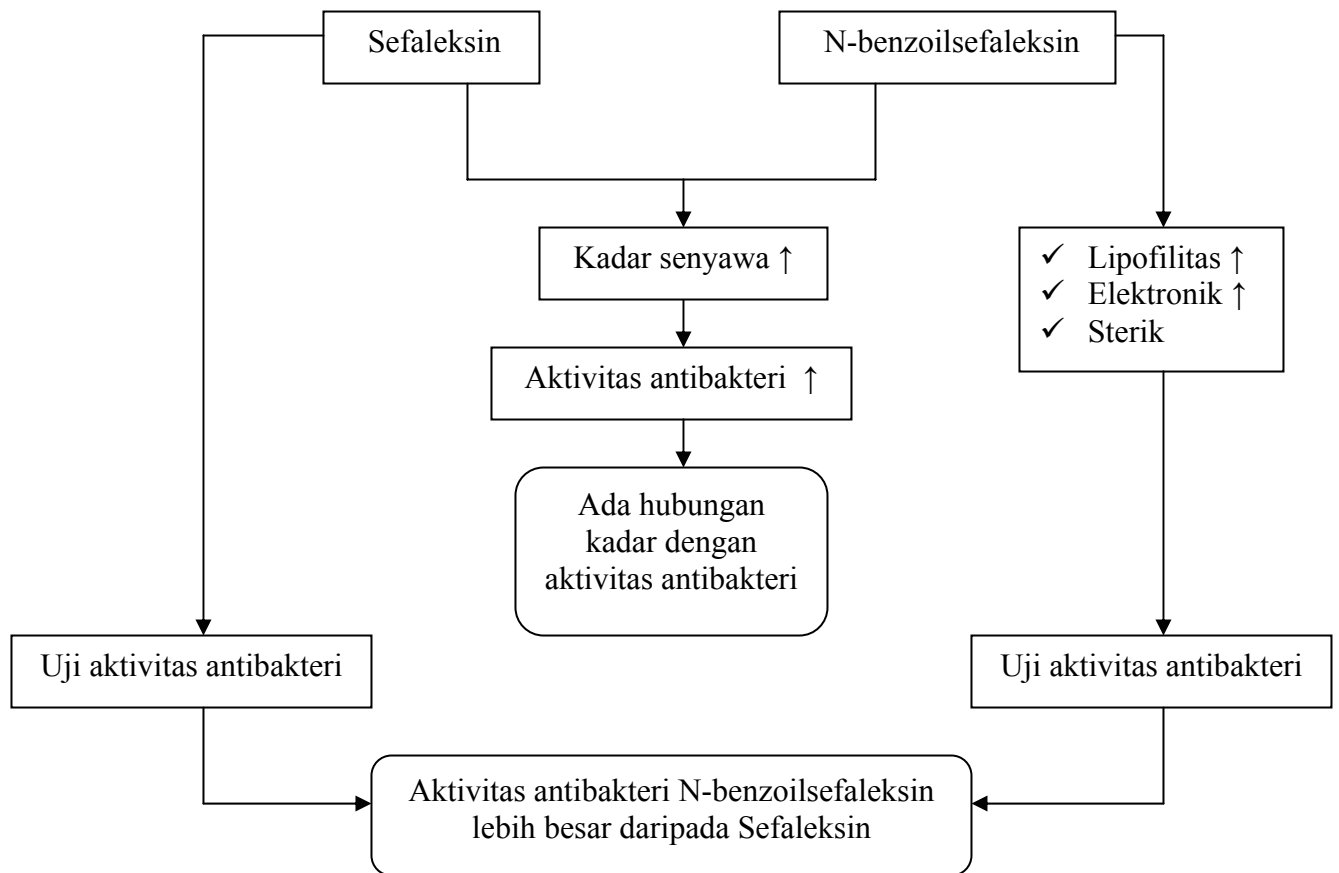
Selama proses sintesis memungkinkan terjadinya pembukaan cincin β -laktam, sehingga penetapan kadar sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin perlu dilakukan karena yang mempunyai aktivitas antibiotik adalah senyawa yang cincin β -laktamnya masih dalam bentuk utuh, belum terurai. Bila sudah terurai maka sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin akan turun aktivitas antibakterinya atau hilang aktivitas antibakterinya (Martin, 1982; Remington's, 1995).

Penurunan kadar antibiotika akan sangat mempengaruhi aktivitas antibakteri. Dalam bidang pengobatan, penurunan kadar antibiotika akan menyebabkan penurunan efek terapi dan meningkatkan kemungkinan terjadinya resistensi kuman terhadap sefaleksin. Berdasarkan bahwa besarnya aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh besarnya kadar sehingga dapat dihipotesakan bahwa ada hubungan yang linier antara kadar dengan aktivitas antibakteri dari sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin. Untuk membuktikan hipotesa tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan penetapan kadar dan uji aktivitas antibakteri sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin, sehingga dapat diketahui apakah ada hubungan antara kadar dengan aktivitas antibakteri.

Kadar sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin yaitu bentuk β -laktam yang masih utuh dapat ditetapkan dengan metode iodometri untuk mengetahui prosentase kadarnya. Kadar senyawa ini dihubungkan dengan aktivitasnya terhadap bakteri pada berbagai konsentrasi untuk mengetahui diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri. Senyawa aktif yaitu cincin β -laktam utuh berikatan dengan enzim transpeptidase sebagai reseptor dalam sel bakteri (Jawetz *et al.*, 1996).

Hubungan antara kadar (%) sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dengan diameter daerah hambatan pertumbuhan kuman (mm) dapat dihubungkan dalam suatu kurva aktivitas yang menunjukkan kesetaraan hubungan antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri. Sehingga dapat dilakukan perbandingan aktivitas antibakteri antara sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

3.2 Skema Kerangka Konseptual



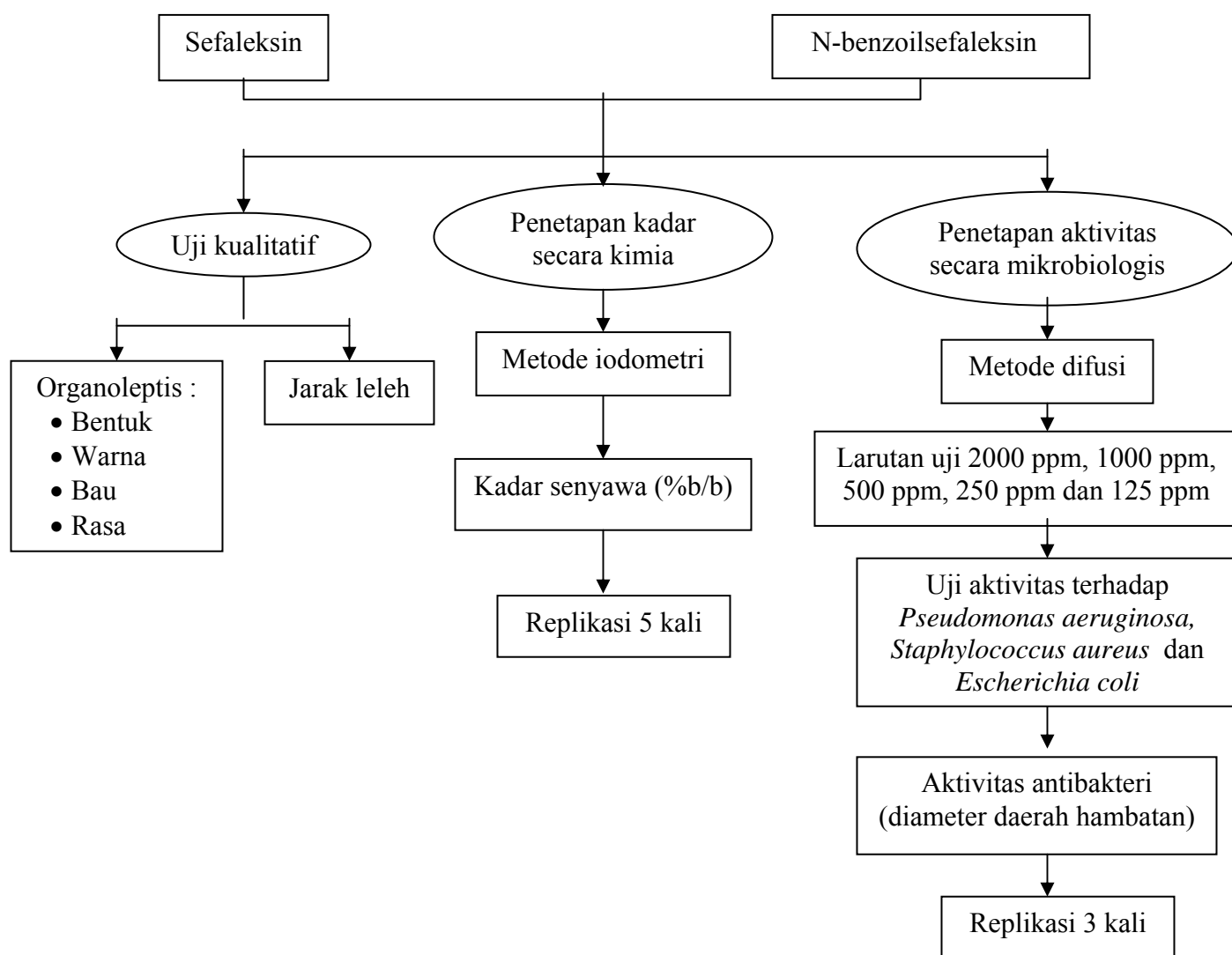
Gambar 3.1 Diagram alur kerangka konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

1 Rancangan Penelitian

Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dilakukan uji secara organoleptis dan jarak leleh. Kemudian ditetapkan kadarnya dengan metode iodometri. Lalu ditimbang sampel sefaleksin dan sampel N-benzoilsefaleksin sejumlah tertentu sehingga didapatkan kadar senyawa aktif 2000 ppm, diencerkan dan diuji aktivitasnya terhadap bakteri dengan metode difusi. Secara ringkas dapat dilihat pada gambar 4.1 berikut :



Gambar 4.1 Diagram alur rencana penelitian

2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

2.1 Identifikasi Bakteri

- (1) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 (Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya)
- (2) Kristal violet
- (3) Larutan lugol
- (4) Alkohol 95 %
- (5) Sefranin
- (6) Trypticase Soy Agar
- (7) Tetrametil-p-fenildiamin dihidroklorida
- (8) Agar Garam Manitol
- (9) Tryptone broth
- (10) Pereaksi kovack

2.2 Iodometri

Semua bahan dibawah ini diperoleh dari PT. Merck Indonesia kecuali disebutkan lain.

- (1) Sefaleksin (PT. Interbat, Sidoarjo)
- (2) N-benzoilsefaleksin (Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya)
- (3) Kalium iodat p.a
- (4) Natrium tiosulfat p.a
- (5) Amilum solubel p.a
- (6) Asam sulfat p.a
- (7) Kalium iodida p.a
- (8) Natrium hidoksida p.a
- (9) Iodium p.a
- (10) Natrium asetat p.a
- (11) Asam asetat glasial p.a

2.3 Uji Aktivitas Antibakteri

- (1) Media Antibiotika 1 (Oxoid)
- (2) Natrium klorida isotonis

3 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- (1) Perangkat alat titrasi
- (2) Perangkat alat uji aktivitas mikrobiologi (cawan petri, silinder logam)
- (3) Jangka sorong Chuan Brand
- (4) Spektrofotometer (Spectronic 20 Bausch and Lomb)
- (5) Autoclaff All American Model No. 25X
- (6) Laminar Air Flow Kotteman Model No. 8580
- (7) Inkubator Memert Model No. 8540
- (8) pH meter Fisher Accumet Tipe 230A
- (9) Neraca analitik Sartorius Tipe 2472
- (10) Mikropipet Soccorex
- (11) Electrothermal Melting Point Apparatus Bausch and Lomb

4 Pemeriksaan Kualitatif Terhadap Sefaleksin

4.1 Pemeriksaan Organoleptis

Meliputi pemeriksaan warna, bentuk, bau dan rasa.

4.2 Pemeriksaan Titik Lebur (Singh *et al.*, 1980; Hardjono, 2000)

Bahan berbentuk serbuk, sekitar 1,0 mg dimasukkan ke dalam pipa kapiler gelas dengan diameter kurang lebih 1,0 mm dan tinggi 8,0 cm, kemudian ujung yang lain ditutup. Sampel diusahakan mencapai ujung pipa kapiler yang tertutup dengan cara diketuk-ketuk. Pipa kapiler dipasang pada tempatnya dan penangas dipanaskan secara perlahan-lahan. Pada temperatur sekitar 15°C dibawah titik lebur, nyala api diatur sedemikian rupa sehingga laju kenaikan temperatur 1-2°C per menit. Titik lebur sefaleksin sekitar 183°C-185°C.

5 Pemeriksaan Kualitatif Terhadap N-benzoilsefaleksin

5.1 Pemeriksaan Organoleptis

Meliputi pemeriksaan warna, bentuk, bau dan rasa.

5.2 Pemeriksaan Titik Lebur (Singh *et al.*, 1980)

Bahan berbentuk serbuk, sekitar 1,0 mg dimasukkan ke dalam pipa kapiler gelas dengan diameter kurang lebih 1,0 mm dan tinggi 8,0 cm, kemudian ujung yang lain ditutup. Sampel diusahakan mencapai ujung pipa kapiler yang tertutup dengan cara diketuk-ketuk. Pipa kapiler dipasang pada tempatnya dan penangas dipanaskan secara perlahan-lahan. Pada temperatur sekitar 15°C dibawah titik lebur, nyala api diatur sedemikian rupa sehingga laju kenaikan temperatur 1-2°C per menit. Titik lebur N-benzoilsefaleksin sekitar 190°C-192°C.

6 Penetapan Kadar Larutan Uji Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin Secara Iodometri

6.1 Pembuatan Larutan Baku Primer Kalium Iodat (Basset *et al.*, 1978)

Ditimbang seksama 178,4 mg kalium iodat (BM = 214,02) dan dilarutkan dalam air suling dipindahkan secara kuantitatif pada labu takar 500,0 ml dan ditambahkan air suling sampai garis tanda.

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

Ditimbang 4,964 gram natrium tiosulfat dan dilarutkan dalam air suling bebas CO₂ secukupnya sampai 1000,0 ml.

6.3 Pembuatan Indikator Larutan Kanji (Anonim, 1995)

Ditimbang 0,50 gram amilum solubel, gerus dengan 5 ml air, ditambahkan air sambil terus diaduk hingga volume 100,0 ml, dididihkan selama beberapa menit, dinginkan dan saring.

6.4 Pembakuan Larutan Natrium Tiosulfat Dengan Larutan Baku Primer Kalium Iodat (Basset *et al.*, 1978)

Larutan kalium iodat 10,0 ml ditambah 5,0 ml asam sulfat dan 150,0 mg kalium iodida, dititrasi dengan larutan baku natrium tiosulfat, ditambahkan

indikator amilum sampai warna biru tepat hilang. Penambahan indikator larutan amilum dilakukan saat akan mencapai titik titrasi.

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

Kalium iodida 3,6 g dilarutkan dalam 100,0 ml air suling dalam labu iodium 1000,0 ml dan ditambahkan 2,538 g iodium lalu masukkan dalam labu iodium. Air suling ditambahkan sampai volume 1000,0 ml dan dikocok kuat agar iodium benar-benar larut.

6.6 Pembakuan Larutan Iodium Dengan Larutan Natrium Tiosulfat

Dipipet 10,0 ml larutan iodium dan dimasukkan dalam labu iodium. Dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat sampai warna biru tepat hilang. Pemberian indikator larutan kanji dilakukan saat akan mencapai titik akhir titrasi.

6.7 Pembuatan Larutan NaOH 1,0 N (Anonim, 1979)

Ditimbang 40,01 g NaOH kemudian dilarutkan dalam aquadest secukupnya dan ditambahkan aquadest sampai 1000,0 ml.

6.8 Pembuatan Asam klorida 1,0 N (Anonim, 1979)

Pipet 1,0 ml asam klorida pekat, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dan ditambahkan aquadest hingga garis tanda

6.9 Pembuatan Larutan Uji Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin

Ditimbang sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin masing-masing dengan seksama 50,0 mg, kemudian dilarutkan dengan air suling secukupnya. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 ml kemudian dikocok selama 30 menit. Ditambahkan air suling sampai 50,0 ml. Kemudian dilakukan masing-masing penetapan kadar senyawa aktifnya.

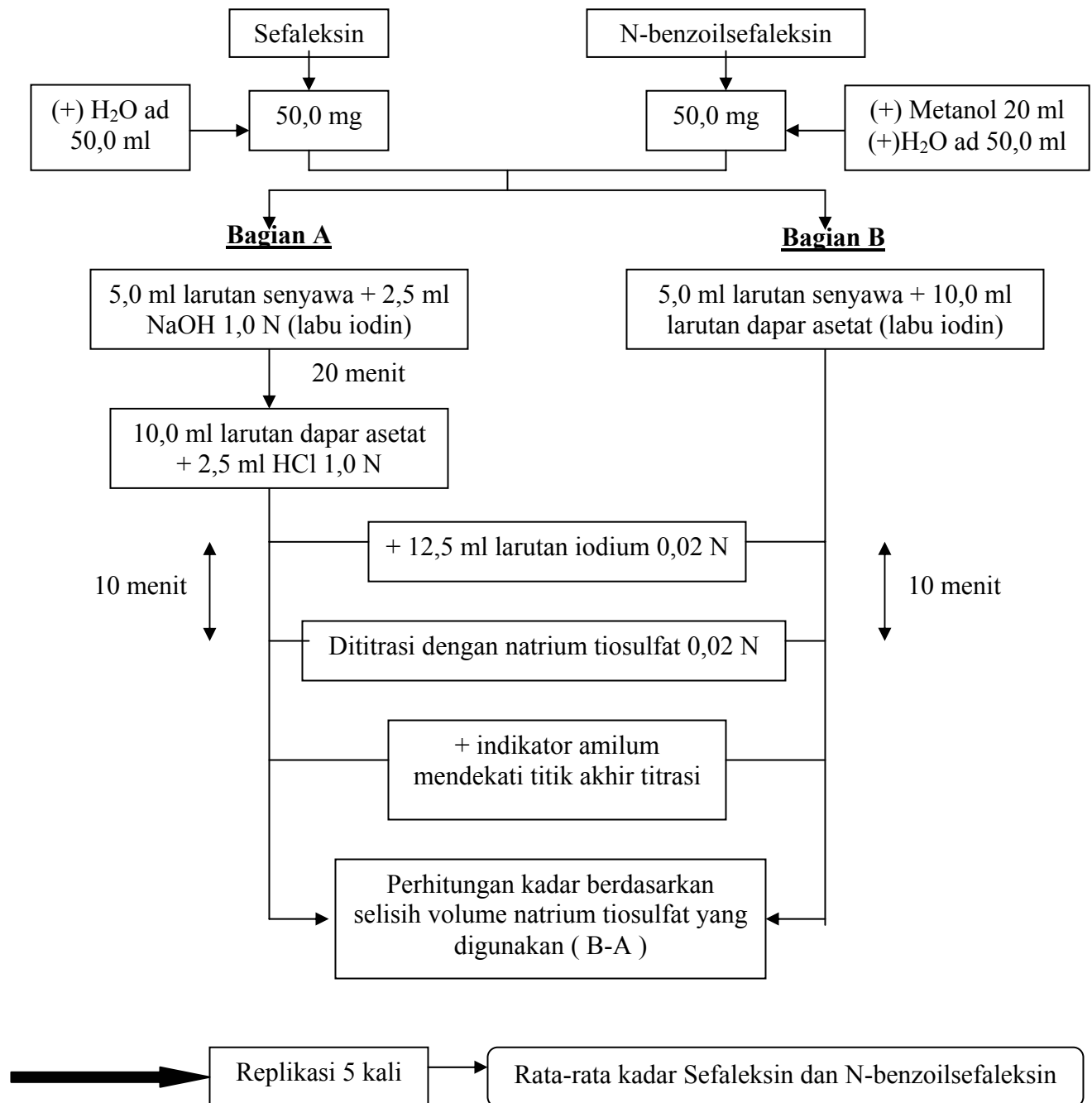
6.10 Penetapan Kadar Senyawa Cincin β -Laktam Terurai Dari Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin

Dimasukkan masing-masing 10,0 ml larutan uji sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dalam labu iodin. Ditambahkan 5,0 ml NaOH 1,0 N dan dibiarkan selama 20 menit dalam labu iodin. Ditambahkan 20,0 ml larutan dapar yang mengandung 5,44 % b/v natrium asetat dan 2,40 % b/v asam asetat glasial, 5,0 ml asam klorida 1,0 N. Ditambahkan larutan iodium 0,02 N sebanyak 25,0 ml dan dibiarkan selama 20 menit. Kemudian dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat 0,02 N sampai warna biru tepat hilang. Sebagai indikator adalah larutan kanji yang ditambahkan mendekati titik akhir titrasi. Volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi dinyatakan dengan A (Anonim, 1979). Secara ringkas dapat dilihat pada gambar 4.2 pada halaman berikutnya.

6.11 Penetapan Kadar Senyawa Cincin β -Laktam Utuh Dan Senyawa Cincin β -Laktam Terurai Dari Sefaleksin Dan N-benzoilsefaleksin

Dimasukkan masing-masing 10,0 ml larutan uji sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dalam labu iodin. Ditambahkan 20,0 ml larutan dapar natrium asetat dan asam asetat glasial. Ditambahkan larutan iodine 0,02 N sebanyak 25,0 ml dan dibiarkan selama 20 menit. Kemudian dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat sampai warna biru tepat hilang. Indikator yang digunakan adalah larutan kanji yang ditambahkan mendekati titik akhir titrasi. Volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi dinyatakan dengan B (Anonim, 1979). Secara ringkas dapat dilihat pada gambar 4.2 pada halaman berikutnya.

6.12 Diagram alur kerja penetapan kadar sefalekssin dan N-benzoilsefalekssin dengan metode iodometri



Gambar 4.2 Diagram alur kerja penetapan kadar Sefaleksin dan N-benzoilsefalekssin secara iodometri

6.13 Replikasi

Tahapan kerja penetapan kadar sefalekssin dan N-benzoilsefalekssin dilakukan 5 kali sehingga didapat 5 hasil penetapan kadar secara iodometri.

7 Identifikasi Bakteri

7.1 Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

7.1.1 Pewarnaan gram (Benson, 1998)

Suspensi kuman dalam air suling steril pada gelas obyek dikeringkan di udara terbuka dan difiksir dengan cara melewatkan gelas obyek diatas lampu spiritus beberapa kali. Kristal violet diteteskan pada gelas obyek dan dibiarkan selama 20 detik. Sisa kristal violet dibuang dan dicuci dengan air suling. Tetesi dengan larutan lugol, diamkan 1 menit. Warna yang terbentuk dihilangkan dengan alkohol 95 % selama 20-30 detik, segera dibilas air. Lalu sefranin diteteskan dan didiamkan selama 10-30 detik. Sisa sefranin dibilas dengan air. Warna merah menunjukkan Gram-negatif.

7.1.2 Tes Oksidasi (Benson, 1998)

Pada koloni dari kuman *Pseudomonas aeruginosa* dalam media Trypticase Soy Agar ditetesi dengan pereaksi Tetrametil-p-fenildiamin dihidroklorida. Pereaksi ini akan teroksidasi oleh sitokrom oksidase oksigen bebas dari kuman *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil pengamatan adalah terjadi perubahan warna pereaksi dari merah muda terang menjadi merah kecoklatan dan akhirnya berubah hitam pada permukaan koloni.

7.2 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

7.2.1 Pewarnaan Gram (Benson, 1998)

Suspensi kuman dalam air suling steril pada gelas obyek dikeringkan di udara terbuka dan difiksir dengan cara melewatkan gelas obyek diatas lampu spiritus beberapa kali. Kristal violet diteteskan pada gelas obyek dan dibiarkan selama 20 detik. Sisa kristal violet dibuang dan dicuci dengan air suling. Tetesi dengan larutan lugol, diamkan 1 menit. Warna yang terbentuk dihilangkan dengan alkohol 95 % selama 20-30 detik, segera dibilas air. Lalu sefranin diteteskan dan didiamkan selama 10-30 detik. Sisa sefranin dibilas dengan air. Warna biru ungu menunjukkan Gram-positif.

7.2.2 Tes Pada Agar Garam Manitol (Finegold & Martin, 1982; Benson, 1998; Prescott *et al.*, 2002)

Staphylococcus ditanam pada media agar garam manitol, diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam, maka akan terbentuk lingkaran kuning di sekitar pertumbuhan.

7.3 Identifikasi *Escherichia coli*

7.3.1 Pewarnaan Gram (Benson, 1998).

Suspensi kuman dalam air suling steril pada gelas obyek dikeringkan di udara terbuka dan difiksir dengan cara melewatkan gelas obyek diatas lampu spiritus beberapa kali. Kristal violet diteteskan pada gelas obyek dan dibiarkan selama 20 detik. Sisa kristal violet dibuang dan dicuci dengan air suling. Tetesi dengan larutan lugol, diamkan 1 menit. Warna yang terbentuk dihilangkan dengan alkohol 95 % selama 20-30 detik, segera dibilas air. Lalu sefranin diteteskan dan didiamkan selama 10-30 detik. Sisa sefranin dibilas dengan air. Warna merah menunjukkan Gram-negatif.

7.3.2 Tes Indol (Benson, 1998)

Beberapa koloni dari biakan diambil dengan sengkeliit lurus steril dan ditanam pada *Tryptone broth*. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembacaan hasil dilakukan dengan penambahan pereaksi Kovack 10-12 tetes melalui dinding tabung. Pada pembiakan akan terbentuk cincin merah pada bagian permukaannya.

8 Uji Aktivitas Antibakteri Larutan Uji Sefalekssin Dan N-benzoilsefalekssin Terhadap Kuman *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

8.1 Pembuatan Media Antibiotika 1

Media Antibiotika 1 ditimbang 27,0 g dan dilarutkan dalam 1 liter air kemudian dididihkan. Media disterilkan dalam autoclav pada suhu 121°C selama 15 menit (Finegold & Martin, 1982).

8.2 Pembuatan Inokulum Kuman

Biakan kuman ditanam pada media Antibiotika 1 miring dalam tabung reaksi secara merata. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suatu ose koloni bakteri dari biakan padat disuspensikan dalam larutan natrium klorida isotonis sebanyak 5,0 ml dan dikocok. Serapan suspensi kuman diukur dengan spektrofotometer lembayung ungu / tampak (ultraviolet) pada panjang gelombang 580 nm sedemikian rupa sehingga dengan pengenceran tertentu diperoleh transmitten 25 % (Anonim, 1995; Benson, 1998). Sebagai blanko digunakan natrium klorida isotonis.

8.3 Pembuatan Larutan Uji Antibakteri

Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin masing-masing ditimbang dengan seksama sehingga mengandung % kadar yang sesuai yang telah ditentukan melalui metode iodometri :

$$W = \frac{100}{\chi} \times n$$

W = Berat sampel sefaleksin dan sampel N-benzoilsefaleksin yang akan ditimbang

χ = % kadar sefaleksin dan N-benzoil sefaleksin

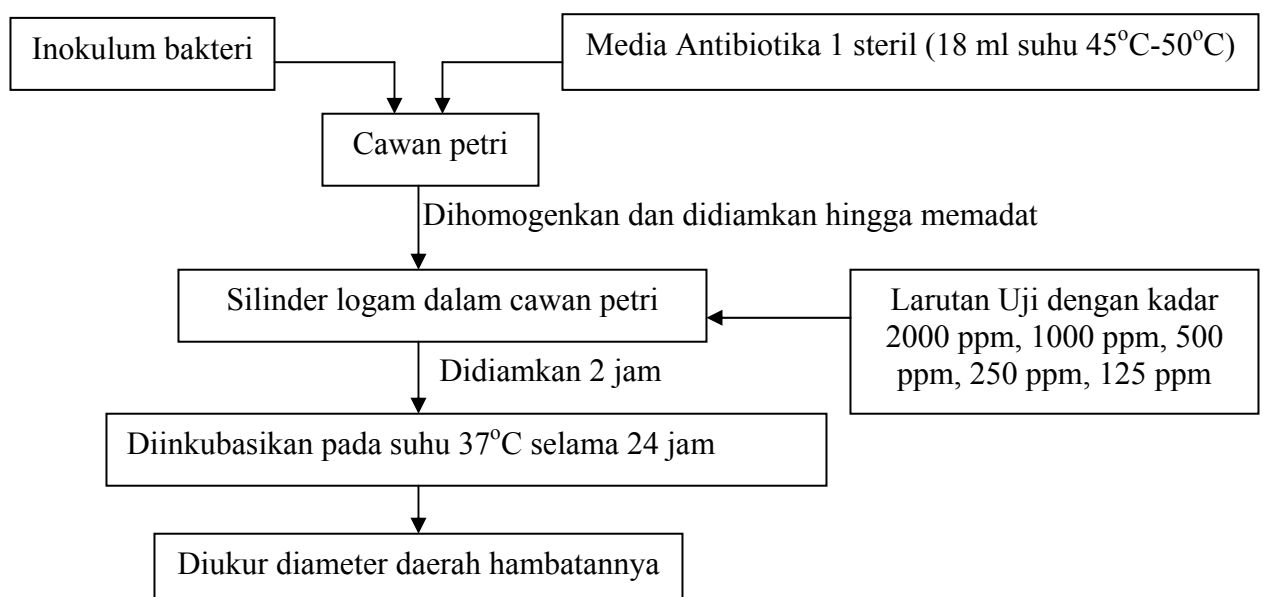
n = Kadar sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dari metode iodometri (50 mg)

Setelah ditimbang, masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan air suling sampai tepat tanda hingga didapatkan kadar masing-masing sebesar 2000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran :

- (1) Dipipet 5,0 ml larutan induk 2000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan air suling ad 10,0 ml (1000,0 ppm)
- (2) Dipipet 5,0 ml larutan induk 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan air suling ad 10,0 ml (500,0 ppm)
- (3) Dipipet 5,0 ml larutan induk 500,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan air suling ad 10,0 ml (250,0 ppm)
- (4) Dipipet 5,0 ml larutan induk 250,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan air suling ad 10,0 ml (125,0 ppm)

8.4 Penentuan Aktivitas Antibakteri (Barnett, 1997; Benson, 1998; Prescott, 2002)

Ke dalam cawan petri dengan diameter 9,0 cm dimasukkan secara aseptis 50,0 μ l -100,0 μ l inokulum bakteri (dilakukan orientasi sehingga didapat sejumlah inokulum bakteri yang dapat memberikan diameter hambatan yang jelas terlihat). Media Antibiotika 1 steril sebanyak 18 ml suhu 45°C-50°C dituang ke dalam cawan petri berisi inokulum bakteri. 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. Larutan uji sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin diteteskan kedalam silinder logam sebanyak 200,0 μ l. Kemudian didiamkan 2 jam pada suhu kamar. Cawan petri diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter daerah hambatan diukur dengan mengukur daerah jernih dengan jangka sorong. Secara ringkas dapat dilihat pada gambar 4.3 dibawah ini :



Gambar 4.3 Diagram alur kerja uji aktivitas antibakteri

8.5 Replikasi

Tahapan kerja uji aktivitas antibakteri dilakukan sebanyak 3 kali dari tiap kadar larutan uji untuk tiap bakteri.

9 Analisis Data

9.1 Rumus Perhitungan Kadar N-benzoilsefaleksin Dengan Metode Titrasi Iodometri

$$(B-A) \frac{N}{0,02} \times E \frac{BM \text{ N-benzoilsefaleksin}}{BM \text{ sefaleksin monohidrat}}$$

B = Volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa cincin β -laktam utuh dan senyawa cincin β -laktam terurai dari sefaleksin dan n-benzoilsefaleksin

A = Volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa cincin β -laktam terurai dari sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin

N = Normalitas natrium tiosulfat

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

9.2 Standar Deviasi (Ritchel, 1986)

Data-data yang diperoleh dari penentuan kadar senyawa pembanding Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin ditentukan rata-rata dan standar deviasinya dengan rumus :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (\chi - \bar{\chi})^2}{n - 1}}$$

Keterangan : S = standar deviasi

χ = kadar senyawa

n = jumlah sampel

$\bar{\chi}$ = kadar senyawa rata-rata

9.2 Uji Aktivitas

Dari hasil pengamatan pada masing-masing antibakteri akan diperoleh dua variabel, yaitu :

Variabel χ : kadar senyawa antibakteri

Variabel y : diameter daerah hambatan rata-rata

Untuk mengetahui ada tidaknya korelasi linier antara variabel χ dan y dilakukan uji regresi dan perhitungan koefisien korelasi.

Jika $r_{\text{hitung}} > r_{\text{tabel}}$ maka dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi linier antara variabel χ dan y , maka untuk selanjutnya dapat dibuat persamaan regresi :

$$y = b\chi + a$$

$$b = \frac{n \times \sum \chi y - (\sum \chi) \times (\sum y)}{n \times \sum \chi^2 - (\sum \chi)^2}$$

$$a = y - b\chi$$

Aktivitas antibakteri sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dapat dilihat dari nilai b (slope) pada persamaan regresi antara logaritma konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) terhadap diameter daerah hambatan (mm) dari masing-masing bakteri. Untuk mengetahui adanya perbedaan aktivitas antibakteri antara N-benzoilsefaleksin dengan sefaleksin dari berbagai kadar, maka dilakukan evaluasi dengan uji t dua sampel bebas, dengan :

H_0 : Tidak ada perbedaan aktivitas antara N-benzoilsefaleksin dengan sefaleksin

H_a : Ada perbedaan aktivitas antara N-benzoilsefaleksin dengan sefaleksin

Harga t (hitung) dapat dilihat dari rumus sebagai berikut :

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times (S_1)^2 + (n_2 - 1) \times (S_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\chi_1 - \chi_2}{S_p \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Bila $t_{\text{hitung}} > t_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak atau dapat dikatakan bahwa ada perbedaan aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin dengan sefaleksin pada $\alpha = 0,05$.

BAB V

HASIL PENELITIAN

1. Hasil Identifikasi Senyawa Obat

1.1 Hasil Identifikasi Sefaleksin

Hasil identifikasi Sefaleksin secara organoleptis yaitu bentuk, warna, bau dan rasa serta identifikasi dengan jarak leleh dapat dilihat pada tabel V.1.

Tabel V.1 Hasil identifikasi Sefaleksin secara organoleptis dan jarak leleh.

No.	Sifat fisika	Hasil pengamatan	Data pustaka (Hardjono, 2000)
1.	<u>Organoleptis :</u> a. Bentuk b. Warna c. Bau d. Rasa	Serbuk Putih Kuning Khas Tidak berasa	Serbuk Putih Kuning Khas Tidak berasa
2.	Jarak leleh	183°C – 185°C	183°C – 185°C

1.2 Hasil Identifikasi N-benzoilsefaleksin

Hasil identifikasi N-benzoilsefaleksin secara organoleptis yaitu bentuk, warna, bau dan rasa serta identifikasi dengan jarak leleh dapat dilihat pada tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil identifikasi N-benzoilsefaleksin secara organoleptis dan jarak leleh.

No.	Sifat fisika	Hasil pengamatan	Data pustaka (Hardjono, 2000)
1.	<u>Organoleptis :</u> a. Bentuk b. Warna c. Bau d. Rasa	Serbuk Putih Tulang Khas Tidak berasa	Amorf Putih Tulang Khas Tidak berasa
2.	Jarak leleh	189°C – 192°C	190°C – 192°C

2. Hasil Penentuan Kadar

2.1 Hasil Penentuan Kadar Senyawa Sefaleksin Dengan Metode Iodometri

Hasil penentuan kadar senyawa sefaleksin monohidrat secara Iodometri dapat dilihat pada tabel V.3.

Tabel V.3 Hasil penentuan kadar senyawa sefaleksin monohidrat (contoh perhitungan dapat dilihat pada lampiran 1)

No.	Sampel (g)	Normalitas $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (N)	Na ₂ S ₂ O ₃ yang dibutuhkan untuk titrasi (ml)		Normalitas I ₂ (N)	Kadar senyawa Sefaleksin monohidrat (%b/b)
			A	B		
1	0,0501	0,0204	8,60	11,35	0,0214	98,84
2	0,0503	0,0191	8,85	11,80	0,0204	99,12
3	0,0502	0,0191	8,60	11,55	0,0204	99,12
4	0,0501	0,0191	8,90	11,85	0,0210	98,96
5	0,0503	0,0191	8,75	11,70	0,0210	98,96
% Kadar Sefaleksin monohidrat rata-rata					$\bar{\chi} = 99,00$	
SD = ± 0,11						

Keterangan :

A = Volume natrium tiosulfat rata-rata (hasil titrasi 3 kali) yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa cincin β -laktam terurai dari sefaleksin monohidrat

B = Volume natrium tiosulfat rata-rata (hasil titrasi 3 kali) yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa cincin β -laktam utuh dan senyawa cincin β -laktam terurai dari sefaleksin monohidrat

2.2 Hasil Penentuan Kadar Senyawa N-benzoilsefaleksin Dengan Metode Iodometri

Hasil penentuan kadar senyawa N-benzoil sefaleksin secara Iodometri dapat dilihat pada tabel V.4.

Tabel V.4 Hasil penentuan kadar senyawa N-benzoilsefaleksin (contoh perhitungan dapat dilihat pada lampiran 2)

No.	Sampel (g)	Normalitas $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (N)	Na ₂ S ₂ O ₃ yang dibutuhkan untuk titrasi (ml)		Normalitas I ₂ (N)	Kadar senyawa N-benzoilsefaleksin (%b/b)
			A	B		
1	0,0502	0,0200	8,05	10,25	0,0214	97,84
2	0,0501	0,0200	8,10	10,30	0,0211	97,84
3	0,0502	0,0208	8,05	10,20	0,0207	99,30
4	0,0503	0,0206	8,20	10,35	0,0192	98,53
5	0,0501	0,0208	8,05	10,15	0,0190	97,27
% Kadar N-benzoil sefaleksin rata-rata					$\bar{x} =$	98,16
SD = ± 0,70						

Keterangan :

A = Volume natrium tiosulfat rata-rata (hasil titrasi 3 kali) yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa cincin β-laktam terurai dari N-benzoil sefaleksin

B = Volume natrium tiosulfat rata-rata (hasil titrasi 3 kali) yang dibutuhkan untuk titrasi kadar senyawa cincin β-laktam utuh dan senyawa cincin β-laktam terurai dari N-benzoil sefaleksin

3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri (Diameter Daerah Hambatan)

3.1 Aktivitas Antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Aktivitas antibakteri Sefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dapat dilihat pada tabel V.5. Sedangkan untuk aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dapat dilihat pada tabel V.6.

Tabel V.5 Diameter daerah hambatan larutan uji Sefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

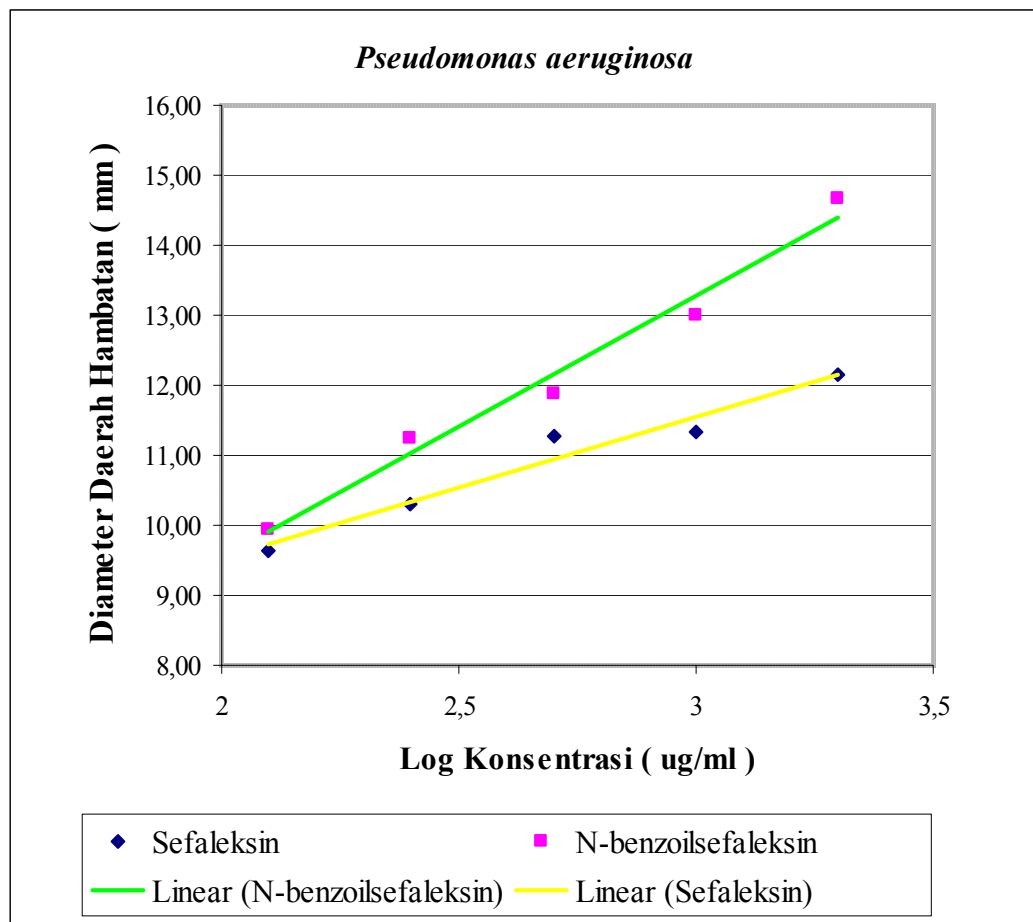
No.	Kadar Senyawa Sefaleksin (µg/ml)	Diameter daerah hambatan Senyawa Sefaleksin (mm)				
		Replikasi			Rata-rata	SD
		I	II	III		
1.	2019,60	12,76	11,82	11,88	12,15	0,53
2.	1009,80	11,42	11,32	11,28	11,34	0,08
3.	504,90	12,02	10,64	11,20	11,29	0,70
4.	252,45	11,58	9,06	10,22	10,29	1,26
5.	126,22	10,56	9,06	9,26	9,63	0,81

Tabel V.6 Diameter daerah hambatan larutan uji N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

No.	Kadar Senyawa N-benzoilsefaleksin (µg/ml)	Diameter daerah hambatan Senyawa N-benzoilsefaleksin (mm)				
		Replikasi			Rata-rata	SD
		I	II	III		
1.	2002,46	15,50	14,52	14,02	14,68	0,75
2.	1001,23	13,44	12,52	13,06	13,01	0,47
3.	500,62	11,86	13,04	10,74	11,88	1,16
4.	250,31	11,74	12,44	9,54	11,24	1,50
5.	125,15	10,68	9,18	9,96	9,94	0,76

Tabel V.7 Perbandingan diameter daerah hambatan rata-rata Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

No.	Kadar senyawa ($\mu\text{g/ml}$)	Diameter daerah hambatan (mm)	
		Sefaleksin	N-benzoilsefaleksin
1.	2002,46	12,15	14,68
2.	1001,23	11,34	13,01
3.	500,62	11,29	11,88
4.	250,31	10,29	11,24
5.	125,15	9,63	9,94



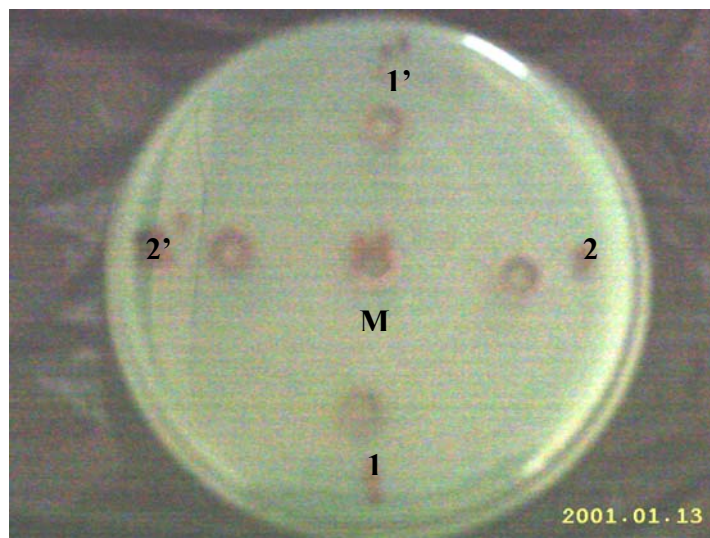
Gambar 5.1 Kurva hubungan antara Log konsentrasi Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap diameter daerah hambatan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Setelah dilakukan analisis regresi antara log kadar senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dengan diameter daerah hambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 maka Persamaan garis regresi dapat dilihat pada Tabel V.8.

Tabel V.8 Persamaan garis antara Log kadar larutan uji dari Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap diameter daerah hambatan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Senyawa	Persamaan garis	Koefisien korelasi (r)
Sefaleksin	$y = 2,023 x + 5,480$	0,977
N-benzoilsefaleksin	$y = 3,737 x + 2,063$	0,990

Gambar di bawah ini merupakan salah satu contoh hasil dari uji aktivitas antibakteri dari senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.



Gambar 5.2 Contoh hasil pengamatan diameter daerah hambatan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

1, 2 = Sefaleksin kadar 2000-1000 µg/ml

1', 2' = N-benzoilsefaleksin kadar 2000-1000 µg/ml

M = Metanol (blanko)

3.2 Aktivitas Antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Aktivitas antibakteri Sefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada tabel V.9. Sedangkan untuk aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada tabel V.10.

Tabel V.9 Diameter daerah hambatan larutan uji Sefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

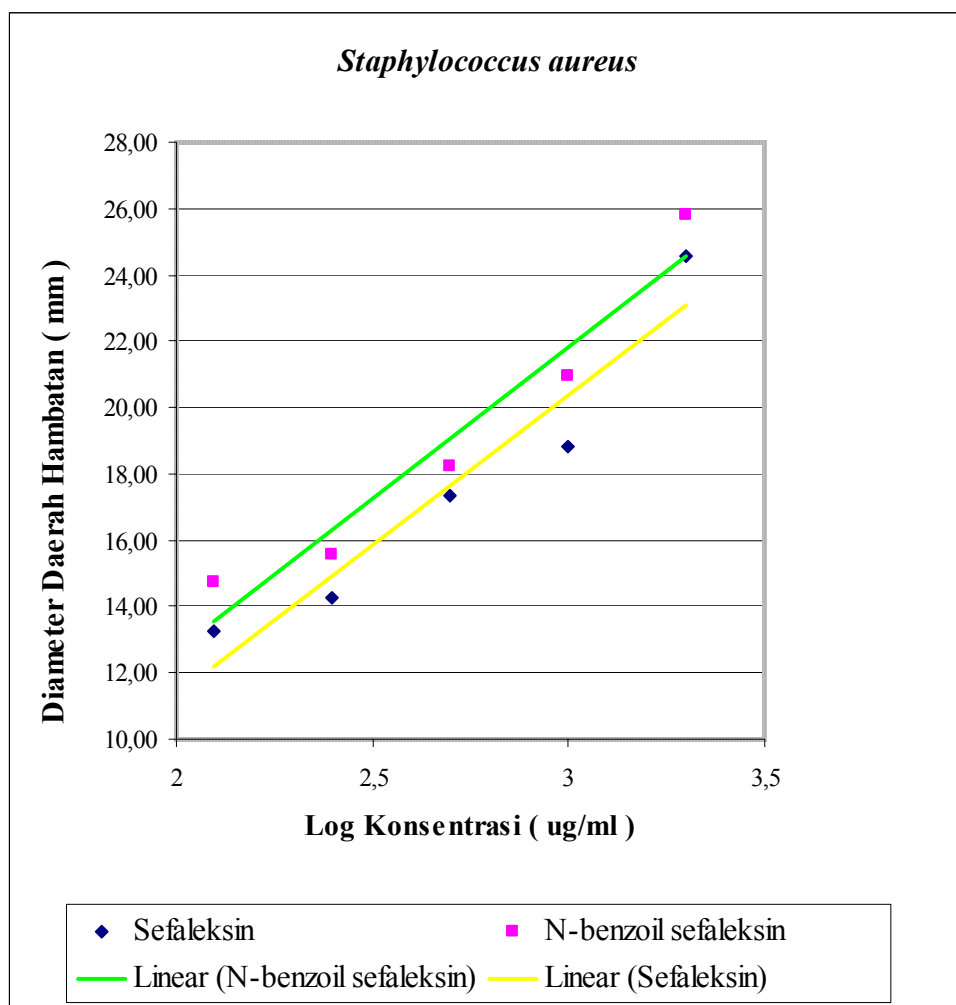
No.	Kadar Senyawa Sefaleksin ($\mu\text{g/ml}$)	Diameter daerah hambatan Senyawa Sefaleksin (mm)				
		Replikasi			Rata-rata	SD
		I	II	III		
1.	2019,60	26,64	24,84	23,16	24,55	1,84
2.	1009,80	19,40	18,68	18,46	18,85	0,48
3.	504,90	17,66	17,46	16,86	17,33	0,43
4.	252,45	14,94	13,98	13,86	14,26	0,58
5.	126,22	13,58	13,46	12,66	13,23	0,49

Tabel V.10 Diameter daerah hambatan larutan uji N-benzoilsefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

No.	Kadar Senyawa N-benzoilsefaleksin ($\mu\text{g/ml}$)	Diameter daerah hambatan Senyawa N-benzoilsefaleksin (mm)				
		Replikasi			Rata-rata	SD
		I	II	III		
1.	2002,46	25,90	25,72	25,72	25,78	0,10
2.	1001,23	21,22	20,80	20,90	20,97	0,22
3.	500,62	19,82	16,24	18,60	18,22	1,82
4.	250,31	15,96	14,84	15,84	15,55	0,62
5.	125,15	15,34	14,02	14,86	14,74	0,68

Tabel V.11 Perbandingan diameter daerah hambatan rata-rata Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

No.	Kadar senyawa ($\mu\text{g/ml}$)	Diameter daerah hambatan (mm)	
		Sefaleksin	N-benzoilsefaleksin
1.	2002,46	24,55	25,78
2.	1001,23	18,85	20,97
3.	500,62	17,33	18,22
4.	250,31	14,26	15,55
5.	125,15	13,23	14,74



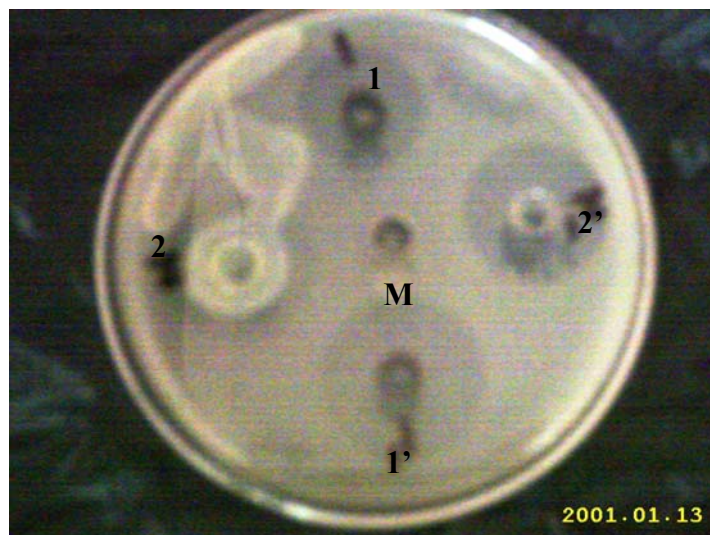
Gambar 5.3 Kurva hubungan antara Log konsentrasi Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap diameter daerah hambatan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Setelah dilakukan analisis regresi antara log kadar senyawa Sefalekslin dan N-benzoilsefalekslin dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 maka Persamaan garis regresi dapat dilihat pada Tabel V.12

Tabel V.12 Persamaan garis antara Log kadar larutan uji dari Sefalekslin dan N-benzoilsefalekslin terhadap diameter daerah hambatan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Senyawa	Persamaan garis	Koefisien korelasi (r)
Sefalekslin	$y = 9,046 x - 6,770$	0,962
N-benzoilsefalekslin	$y = 9,135 x - 5,604$	0,969

Gambar di bawah ini merupakan salah satu contoh hasil dari uji aktivitas antibakteri dari senyawa Sefalekslin dan N-benzoilsefalekslin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Gambar 5.4 Contoh hasil pengamatan diameter daerah hambatan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1, 2 = Sefalekslin kadar 2000-1000 $\mu\text{g/ml}$

1', 2' = N-benzoilsefalekslin kadar 2000-1000 $\mu\text{g/ml}$

M = Metanol (blanko)

3.3 Aktivitas Antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

Aktivitas antibakteri Sefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada tabel V.13. Sedangkan untuk aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada tabel V.14.

Tabel V.13 Diameter daerah hambatan larutan uji sefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

No.	Kadar Senyawa Sefaleksin (µg/ml)	Diameter daerah hambatan Senyawa Sefaleksin (mm)				
		Replikasi			Rata-rata	SD
		I	II	III		
1.	2019,60	13,28	12,66	12,76	12,90	0,34
2.	1009,80	12,80	11,34	11,56	11,90	0,79
3.	504,90	11,24	11,22	11,64	11,37	0,24
4.	252,45	11,22	11,34	10,02	10,86	0,73
5.	126,22	10,06	10,02	10,50	10,19	0,27

Tabel V.14 Diameter daerah hambatan larutan uji N-benzoilsefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

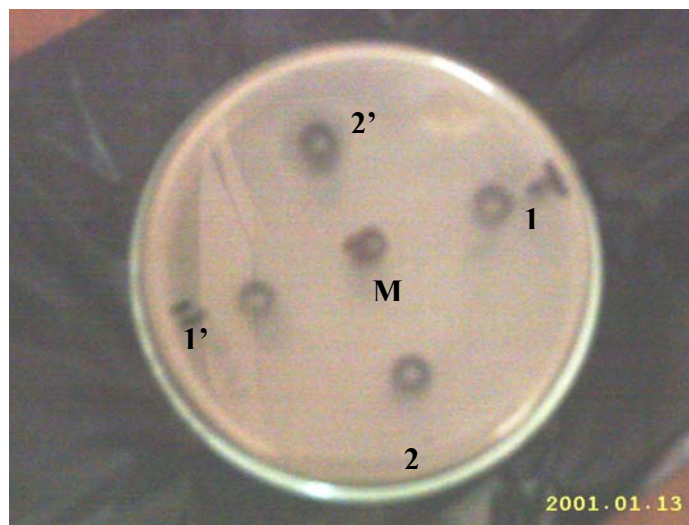
No.	Kadar Senyawa N-benzoilsefaleksin (µg/ml)	Diameter daerah hambatan Senyawa N-benzoilsefaleksin (mm)				
		Replikasi			Rata-rata	SD
		I	II	III		
1.	2002,46	13,96	14,32	14,30	14,19	0,20
2.	1001,23	13,36	12,22	12,78	12,79	0,58
3.	500,62	12,52	12,60	11,20	12,11	0,78
4.	250,31	12,82	12,12	10,84	11,93	1,01
5.	125,15	10,48	11,52	10,28	10,76	0,67

Setelah dilakukan analisis regresi antara log kadar senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin dengan diameter daerah hambatan terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 maka Persamaan garis regresi dapat dilihat pada Tabel V.16.

Tabel V.16 Persamaan garis antara Log kadar larutan uji dari Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap diameter daerah hambatan *Escherichia coli* ATCC 25922

Senyawa	Persamaan garis	Koefisien korelasi (r)
Sefaleksin	$y = 2,146 x + 5,652$	0,991
N-benzoilsefaleksin	$y = 2,565 x + 5,434$	0,969

Gambar di bawah ini merupakan salah satu contoh hasil dari uji aktivitas antibakteri dari senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.



Gambar 5.6 Contoh hasil pengamatan diameter daerah hambatan *Escherichia coli* ATCC 25922
 1, 2 = Sefaleksin kadar 2000-1000 $\mu\text{g/ml}$
 1', 2' = N-benzoilsefaleksin kadar 2000-1000 $\mu\text{g/ml}$
 M = Metanol (blanko)

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini Sefaleksin monohidrat diperoleh dari PT. Meiji Indonesia, Bangil. Sedangkan senyawa N-benzoilsefaleksin diperoleh dari Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Dari hasil identifikasi organoleptis dan jarak leleh yang telah dilakukan menunjukkan bahwa zat tersebut sesuai dengan pustaka, sehingga dapat digunakan untuk bahan penelitian lebih lanjut.

Adapun bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penentuan kadar senyawa dilakukan dengan metode titrasi Iodometri, yang mempunyai keuntungan yaitu tidak diperlukan adanya senyawa pembanding yang murni, sehingga metode ini dapat digunakan untuk menetapkan kadar N-benzoilsefaleksin yang merupakan senyawa baru turunan dari Sefaleksin. Metode Iodometri juga dapat menetapkan senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin yang cincin β -laktamnya masih utuh dan sudah terurai. Molekul Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin yang cincin β -laktamnya sudah terurai akan mengikat iodium.

Dalam penelitian ini dilakukan penambahan NaOH untuk merusak cincin β -laktam Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin. Selain karena pengaruh pH (penambahan NaOH), rusaknya cincin β -laktam juga disebabkan karena pengaruh suhu dan enzim β -laktamase.

Untuk mengetahui kadar senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin ditunjukkan dengan pengurangan titran B (titran senyawa yang cincin β -laktamnya masih utuh dan sudah terurai) dengan titran A (titran senyawa yang cincin β -laktamnya sudah terurai).

Pelarut campuran air-metanol digunakan untuk membuat larutan N-benzoilsefaleksin, hal ini disebabkan karena kedua senyawa mempunyai sifat fisika yang berbeda. Sefaleksin larut dalam air tapi sukar larut dalam metanol, sedangkan N-benzoilsefaleksin larut dalam metanol tapi sukar larut dalam air.

Sehingga untuk mendapatkan perlakuan yang sama dan maka digunakan pelarut campuran air-metanol dengan perbandingan 4:6 dan didapatkan larutan yang jernih.

Dari hasil penetapan diperoleh kadar Sefaleksin rata-rata 99,00 % (b/b) dan kadar N-benzoilsefaleksin rata-rata 98,16 % (b/b). Kadar N-benzoilsefaleksin yang didapat lebih kecil daripada kadar Sefaleksin, hal ini disebabkan karena sebagian cincin β -laktam dari senyawa hasil sintesis mengalami peruraian. Data hasil penetapan kadar ini selanjutnya akan digunakan untuk menghitung kesetaraan bobot N-benzoilsefaleksin terhadap Sefaleksin yang berfungsi sebagai pembanding dalam penentuan aktivitas antibakteri.

Setelah ditentukan kadarnya secara Iodometri, dilakukan uji aktivitas antibakteri yang menggunakan metode difusi lempeng silinder. Dalam metode ini akan diukur diameter daerah hambatannya terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Pada uji aktivitas mikrobiologi dengan metode difusi silinder, ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi besarnya diameter daerah hambatan, antara lain jumlah inokulum, jumlah larutan uji, konsentrasi larutan uji, laju difusi larutan, kepekaan kuman dan masa inkubasi kuman.

Untuk mendapatkan jumlah inokulum yang sesuai maka dilakukan orientasi dengan mengubah-ubah jumlah inokulum kuman sebanyak 50 μ l – 200 μ l. Hasil orientasi menunjukkan bahwa pada inokulum kuman sebanyak 100 μ l untuk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan 50 μ l untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan jumlah larutan uji untuk Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin masing-masing sebesar 200 μ l akan didapatkan diameter daerah hambatan yang jelas dan mudah diamati.

Rentang konsentrasi larutan uji yang digunakan berkisar antara 2000 μ g/ml – 125 μ g/ml. Karena berdasarkan orientasi, pada N-benzoilsefaleksin dengan konsentrasi dibawah 125 μ g/ml tidak didapatkan diameter daerah hambatan terhadap ketiga bakteri. Selain itu pada rentang konsentrasi ini terdapat kenaikan diameter daerah hambatan yang sesuai dengan kenaikan konsentrasi dan tidak terjadi penumpukan diameter daerah hambatan antara konsentrasi yang satu dengan yang lainnya pada kedua senyawa tersebut.

Pelarut campuran air-metanol yang digunakan untuk membuat larutan uji N-benzoilsefaleksin selain untuk menghasilkan larutan uji yang jernih sehingga proses difusinya merata, juga digunakan berdasarkan pertimbangan bahwa pelarut tidak boleh mempunyai aktivitas antibakteri. Pelarut campuran air-metanol selanjutnya digunakan sebagai blangko dan didapatkan hasil bahwa pelarut campuran air-metanol tidak memberikan daerah hambatan.

Pada uji aktivitas antibakteri secara difusi harus diperhatikan beberapa faktor yang mempengaruhi besar kecilnya diameter daerah hambatan yaitu kepekaan dari bakteri yang digunakan, ketebalan media dalam lempeng (cawan Petri), jumlah inokulum kuman, jumlah larutan uji, suhu dan lama inkubasi serta laju difusi larutan uji. Semakin peka bakteri yang digunakan terhadap senyawa uji, maka diameter daerah hambatan semakin besar. Sebaliknya jika bakteri yang digunakan resisten terhadap senyawa uji maka jumlah inokulum kuman dikurangi untuk didapatkan diameter daerah hambatan yang cukup jelas untuk diamati.

Laju difusi larutan uji tergantung pada cara meletakkan silinder logam dalam media, karena dapat mempengaruhi besarnya diameter daerah hambatan. Bila silinder logam terlalu dalam sampai menyentuh dasar cawan petri maka akan menghambat difusi larutan uji sehingga diameter daerah hambatan menjadi lebih kecil atau bahkan tidak terbentuk sama sekali.

Telah dilakukan perbandingan waktu inkubasi kuman selama 24 dan 48 jam. Hasil perbandingan menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi selama 24 jam akan diperoleh diameter daerah hambatan yang optimal (tidak ada lagi penambahan diameter daerah hambatan) dengan batas daerah yang jernih dan keruh cukup jelas. Hal ini disebabkan karena beberapa hal yaitu laju difusi larutan uji yang berbeda tergantung cara meletakkan silinder logam dan kepekaan kuman yang berbeda. Orientasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 24 dan 48 jam karena untuk waktu inkubasi yang lebih dari 48 jam akan didapatkan diameter daerah hambatan yang batas jernih dan keruhnya tidak jelas, bahkan diameternya lebih kecil. Hal ini disebabkan karena setelah lebih dari 48 jam jumlah larutan uji berkurang sehingga kemampuan berdifusinya juga tidak sebesar sebelumnya, sedangkan pertumbuhan kuman semakin tinggi. Sebagai visualisasi dari hasil uji aktivitas terhadap bakteri uji dapat dilihat pada gambar 5.2; 5.4 dan 5.6.

Selama waktu inkubasi diusahakan cawan Petri 37°C karena suhu tersebut termasuk dalam rentang suhu optimum untuk pertumbuhan ketiga bakteri yang digunakan.

Pertumbuhan bakteri dalam cawan Petri dipengaruhi suhu media Agar saat dituang ke dalam cawan Petri yang sudah diberi inokulum bakteri dalam jumlah tertentu. Suhu penuangan media berkisar antara 45°C – 50°C. Jika suhu penuangan diatas 50°C maka sebagian besar bakteri akan mati, sehingga pertumbuhan kuman yang dihasilkan kurang optimal. Pada suhu dibawah 45°C, media Agar sudah mulai memadat sehingga sulit dituang. Oleh karena itu suhu penuangan media juga harus diperhatikan pada saat melakukan uji aktivitas mikrobiologi.

Aktivitas antibakteri Sefalekssin dan N-benzoilsefalekssin dinyatakan dengan besarnya diameter daerah hambatan (mm). Lebih lanjut dibuat persamaan regresi antara kadar larutan uji (log kadar) dengan diameter daerah hambatan. Persamaan ini digunakan untuk mengetahui hubungan antara dosis dengan diameter daerah hambatan, yang dapat diketahui dengan nilai r (koefisien korelasi) dan nilai F.

Dari perhitungan (lampiran 5 - lampiran 10) diperoleh harga r hitung dan F hitung yang lebih besar daripada r tabel dan F tabel. Lebih ringkasnya dapat dilihat pada lampiran 4.

Nilai r tabel pada $\alpha = 0,05$ dan derajat bebas 3 adalah 0,878 (lampiran 14). Nilai F tabel pada $\alpha = 0,05$ adalah 10,13 (lampiran 15). Dari data tersebut di atas, didapatkan harga r hitung yang lebih besar daripada r tabel dan dan F hitung yang lebih besar daripada F tabel. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa ada korelasi linier yang bermakna antara kadar larutan uji dengan diameter daerah hambatan.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri senyawa Sefalekssin dan N-benzoilsefalekssin terhadap ketiga bakteri, terlihat bahwa pada setiap kadar yang sama menunjukkan adanya perbedaan diameter daerah hambatan rata-rata. Pada tabel V.7, tabel V.11 dan tabel V.15 dapat diketahui bahwa hasil uji aktivitas antibakteri N-benzoilsefalekssin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922

menghasilkan diameter daerah hambatan yang lebih besar dibandingkan Sefaleksin.

Pada kurva kadar senyawa N-benzoilsefaleksin terhadap diameter daerah hambatan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan derajat kemiringan yang lebih besar daripada Sefaleksin (gambar 5.1; 5.3 dan 5.5). Hal ini menunjukkan aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin lebih besar daripada Sefaleksin.

Perbandingan aktivitas antibakteri secara umum dapat dilihat dari nilai b (slope) dari persamaan regresi masing-masing bakteri. Semakin besar nilai b maka aktivitas antibakteri makin tinggi.

Untuk mengetahui adanya perbedaan aktivitas antibakteri antara Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin terhadap bakteri tertentu maka dilakukan uji t dua sampel bebas (*pooled t test*) dengan membandingkan t hitung dengan t tabel, ternyata yang menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antibakteri antara Sefaleksin dengan N-benzoilsefaleksin adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (lampiran 11).

Sedangkan untuk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 walaupun dari data angka-angka terdapat perbedaan diameter daerah hambatan antara Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin (diameter daerah hambatan N-benzoilsefaleksin lebih besar dari Sefaleksin) tetapi setelah dianalisa secara statistika dengan uji t dua sampel bebas (untuk variabel slope), menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan aktivitas antibakteri antara Sefaleksin dengan N-benzoilsefaleksin (lampiran 12 dan lampiran 13).

Dari hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa penambahan gugus benzoil pada Sefaleksin dapat meningkatkan aktivitas antibakteri pada bakteri uji terutama pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Dengan penambahan gugus benzoil pada Sefaleksin, senyawa hasil substitusi menjadi bersifat lebih asidik karena terjadi perubahan dari amina primer menjadi amida. Peningkatan keasaman ini menjadikan kemampuan ionisasi dari gugus NH_2^+ makin kecil sehingga senyawa lebih stabil dalam bentuk molekul, sehingga absorpsi akan meningkat dan penetrasi senyawa ke sel bakteri akan lebih baik. Hal ini berarti bahwa dengan bertambahnya sifat keasaman senyawa hasil sintesis menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Tetapi peningkatan keasaman senyawa N-benzoilsefaleksin ini ternyata kurang menentukan peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Meningkatnya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 lebih ditentukan oleh sifat kimia fisika yang lain yaitu sifat lipofilitas senyawa.

Dari hasil uji aktivitas antibakteri secara keseluruhan terlihat bahwa aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin dan Sefaleksin pada konsentrasi yang sama memberikan diameter daerah hambatan yang paling besar pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 . Sedangkan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 didapatkan diameter daerah hambatan yang hampir sama.

Perbedaan aktivitas ini, pertama, dapat disebabkan karena perbedaan jenis bakteri uji. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 termasuk bakteri Gram positif, sedangkan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 termasuk bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif dan Gram negatif berbeda pada struktur dan komposisi dinding selnya. Komposisi dinding sel bakteri Gram positif mengandung sedikit lipida, sedangkan pada bakteri Gram negatif kandungan lipidanya jauh lebih banyak. Dari perbedaan ini menunjukkan bahwa sifat fisika kimia sangat berperan dalam proses penembusan membran sel.

Perbedaan yang kedua adalah bahwa pada bakteri Gram positif, enzim β -laktamasenya diekskresikan ke dalam media pertumbuhan. Sedangkan pada bakteri Gram negatif, enzim tersebut tetap berada di dalam sel sehingga daya tahannya lebih baik dalam menghadapi masuknya inti β -laktam.

Perbedaan aktivitas antara *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 disebabkan karena adanya perbedaan struktur membran sel sebelah luar antara kedua bakteri tersebut. Pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 membran sel terluarnya antara lain terdiri dari protein saluran porin yang tidak bekerja sebagaimana halnya pada *Escherichia coli* ATCC 25922. Sehingga dengan peningkatan sifat keasaman senyawa hasil sintesis menyebabkan aktivitas senyawa N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 lebih besar daripada Sefaleksin. Sedangkan pada

Escherichia coli ATCC 25922 aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin sama dengan Sefaleksin.

Penambahan gugus benzoil dapat meningkatkan lipofilitas senyawa dan gugus benzoil juga merupakan gugus yang meruah pada rantai Sefaleksin. Gugus yang meruah ini merupakan halangan bagi enzim β -laktamase untuk berikatan dengan cincin β -laktam, sehingga senyawa obat dapat berinteraksi dengan reseptor dalam sel bakteri.

Dengan peningkatan sifat lipofilitas, sifat elektronik dan adanya efek sterik ternyata senyawa hasil sintesis mempunyai aktivitas antibakteri lebih baik dibandingkan dengan Sefaleksin.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

1. Aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 lebih besar dari Sefaleksin.
2. Aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin dan Sefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah sama.
3. Terdapat hubungan yang linier antara kadar dengan aktivitas antibakteri Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin, dengan peningkatan kadar meningkatkan aktivitas antibakteri.

SARAN

Sebaiknya dilakukan uji aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif yang lain untuk mengetahui spektrum aktivitas antibakteri N-benzoilsefaleksin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-3, Jakarta, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. XXXIV, 136-137, 756.
- Anonim, 1989. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*. 29th ed., London, The Pharmaceuticals Press, pp. 105, 173-175.
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4, Jakarta, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 891.
- Anonim, 1996. *The Merck Index*. 12th ed., Rahway, Merck and Co. Inc., pp.328-329.
- Anonim, 2002. *The United States Pharmacopoeia*. 25th ed., Rokville, The United States Pharmacopoeia Convention Inc., pp. 261-261, 1488-1493.
- Barnett, M., 1997. *Microbiology Laboratory Exercises*. 2nd ed., Dubuque, Wm. C. Brown Publishers, p. 83-87, 195-200, 207-210.
- Basset, J., Denney, R.C., Jeffery, G.H. and Mendham, J., 1978. *Vogel's Textbook Quantitative Inorganic Analysis*. 4th ed., New York, Longman Inc., pp. 276-375.
- Benson, H. J., 1998. *Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology*. 7th ed., Boston, WCB Mc Graw-Hill, p. 58-60, 139-141, 155-163, 166-191.
- Bethea RM, Duran BS., Boullion T., 1985. *Statistical Methods for Engineers and Scientists*. 2nd Ed. Volume 57. Marcel Dekker, New York. pp. 624.
- Betina, V., 1983. *The Chemistry and Biology of Antibiotics*. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co., pp. 115-158, 349-380.
- Black, G. J., 1999. *Microbiology, Principles and Exploration*. 2nd ed., New Jersey. Prentice Hall International Inc., p. 351-354.
- Chao, L.L., 1974. *Statistic Methodes and Analysis*. 2nd ed., New York, Mc graw-Hill Book Company, pp. 309-319.
- Colle, J.G., Duguid, J.P., Fraser, A.G. and Marmion, B.P., 1989. *Mackie and Mc Cartney Practical Medical Microbiology*. New York, Churchill Livingstone, pp. 303-313.
- Connors, K.A., 1982. *A Textbook of Pharmaceutical Analysis*. 3rd ed., New York, John Wiley and Sons, pp. 80-87.

- Finegold, S.M. and Martin, W.J., 1982. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 6th ed., St. Louis, The C.V. Mosby Company, pp. 161, 253-254, 649, 672.
- Gilman, A.G., Goodman, L.S. and Gilman, A., 1991. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 8th ed., New York, Mac Millan Pergamon Publishing Co. Inc., pp. 1066-1068, 1085-1089.
- Hakim, L. dan Susidarti, R.A., 1995. Pemantauan Sefaleksin Dalam Darah, Urin dan Feses Tikus Setelah Pemberian N-Benzoil Sefaleksin. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 6 No. 1, hal. 90.
- Hardjono, S., 2002. Sintesis Senyawa Baru Turunan Benzoil-N-Sefaleksin Untuk Meningkatkan Aktivitas Antibakteri Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *Laporan Riset Unggulan Terpadu VIII Bidang Ilmu Kimia dan Proses*, Jakarta, Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, hal.12, 17,19.
- Hou, J.P. and Poole J.M., 1971. β -Lactam antibiotics, their physicochemical properties and biological activities in relation structure, *Journal of Pharmaceutical Science*. 60 : 503-532.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A., 1996, *Microbiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Terjemahan Bonang, G., 20th ed., Jakarta, C.V. EGC Penerbit Buku Kedokteran, hal. 59-67, 160-161, 211-217, 234-241, 249-250.
- Kolthoff, I.M. and Sandell, E.B., 1952. *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis*. 3rd ed., New York, The Mac Millan Company, p. 585-594.
- Lim, D., 1998. *Microbiology*. 2nd ed., boston, WCB Mc Graw-Hill, p. 95-96, 132-133.
- Lorian, V., 1982. *Significance of Medical Microbiology in The Care of Patients*. Baltimore, Williams and Wlikins, pp. 341-358.
- Lund, W., 1994. *The Pharmaceutical Codex*. 12th ed, London, The Pharmaceutical Press, pp.
- Marrelli, L.P., 1975. Cephalexin. Florey, K. (Eds). *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol. 4, New York, Academic Press, p. 21-43.
- Martin, A.R. and Doerge, R.F., 1982. *Buku Teks Wilson dan Gisvold Kimia Farmasi dan Medisinal Organik*. Terjemahan Fatah, A.M., Semarang, IKIP Semarang Press, hal. 231-263.
- Martin, Y.C. and Fisher, E.W., 1983. Semisynthetic antibiotics, In (Topliss, J.G. eds.). *Quantitative Structure-Activity Relationship of Drugs*. New York : Academic Press, 77-130.

- McEvoy, G. K., 2002. *AHFS Drug Informations*. Bethesda, American Society of Health-System Pharmacists Inc., p. 321.
- Miller, J. C. and Miller, J. N., 1993. *Statistic for Analytical Chemistry*. 3rd ed., New York, Ellis Howard PTR Prentice Hall, p. 33-34, 55-57, 104-110.
- Molavi, A., 1990. *Antimicrobial I : Beta Lactam Antibiotics, in Basic Pharmacology in Medicine*. 3rd ed., New York, Mc Graw-Hill Publishing Company, pp. 478-479.
- Nayler, J.H.C., 1973. Advances in penicillin research, in (Harper, N.J. and Simmonds, A.B. eds.), *Advances in Drug Research*, Vol. 7, New York, Academic Press, pp. 1-105.
- Nogrady, T., 1992. *Kimia Medisinal, Pendekatan Secara Kimia*. Terjemahan Raslim, R., Amir, M., 2nd ed., Bandung, ITB, hal. 437-447.
- Parfitt, K., 1999. *Martindale The Complete Drug Reference*. 32nd ed., London, Pharmaceutical Press, p. 178.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R., 1986. *Microbiology*. 5th ed., New York, Mc Graw Hil Company, pp. 510-536.
- Prescott, L.M., Harey, J.P. and Klein, D.A., 2002. *Microbiology*. 5th ed., Boston, Mc Graw-Hill Higher Education, pp. 835-837.
- Rawlins, E.A., 1988. *Bentley's Textbook of Pharmaceutics*. 8th ed., London, University Printing House, pp. 435, 602-603.
- Remington's, 1995. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 28th ed., London, Royal Pharmaceutical Society, pp. 115-116.
- Ritchel, W.A., 1986. *Handbook of Basic Pharmacokinetics*. 3th ed., Cincinnati, Drug Intelligence Publication Inc., pp. 442-445.
- Sasmito. 1996. Pengaruh Enzim Lisozim Terhadap Aktivitas Antibiotika Golongan Sefalosporin (7-ACA) Dan β -Laktam (6-APA). *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 7 No. 4, hal 163.
- Singh, P.R., Gupta, D.S. and Bajpal, K.S., 1980. *Experimental Organic Chemistry*. Volume I, New Delhi, Tata Mc Graw-Hill Publishing Company Limited, pp. 11-12.
- Smith, C.M. and Reynard, A.M., 1992. *Textbook of Pharmacology*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 829, 834.
- Smith, H.J. 1988. *Smith and Williams' Introduction to The Principles of Drug Design*. 2nd ed., London, pp. 277-278.

- Soedigdo S., Soedigdo P., 1977. *Pengantar Cara Statika Kimia*, Bandung ; Penerbit ITB Bandung, hal. 42.
- Soekardjo, B., 1989. *Sintesis dan Hubungan Struktur Dengan Aktivitas In Vitro Dari Suatu Seri Turunan Benzoil-N-Ampisilin Baru*. Disertasi, Eniversitas Airlangga Surabaya.
- Soekardjo, B., Hardjono, S. dan Sondakh, R., 2000. Hubungan Struktur-Aktivitas Obat Antibiotika. Siswandono dan Soekardjo, B. (Editor). *Kimia Medisinal*, Jilid 2, Surabaya, Airlangga University Press, hal. 110- 136.
- Sykes, R.B. and Bush, K., 1995. *Kimia dan Biologi Antibiotika β -Laktam*. Terjemahan Sri Mulyani, Volume 3 Biokimia, Semarang, IKIP Semarang Press, hal. 151-185.
- Yamana, T. and Tsuji, A., 1976. Comparative Stability of Cephalosporins in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 65 No. 7, pp. 1563-1573.

LAMPIRAN 1

Contoh Perhitungan Penentuan Kadar Senyawa Sefaleksin Dengan Metode Iodometri

Perhitungan Ekivalensi

1,0 ml 0,0166 N Iodium setara dengan 4 μ mol Sefalosporin (Sykes & Bush, 1995)

BM Sefaleksin monohidrat = 365,40

$$\text{Mol} = \frac{\text{Gram}}{\text{BM}} \rightarrow \text{Gram} = \text{Mol} \times \text{BM}$$

$$\text{Gram} = 4 \mu\text{mol} \times 365,40 = 1461,6 \mu\text{g} = 1,4616 \text{ mg}$$

Untuk 1,0 ml 0,0200 N Iodium :

$$\frac{0,0200}{0,0166} \times 1,4616 \text{ mg} = 1,7610 \text{ mg} = 1,761 \text{ mg}$$

Dari hasil penelitian diperoleh :

Normalitas Natrium tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) = 0,0204 N

Normalitas Iodium = 0,0214 N

Ekivalensi : Kesetaraan tiap ml 0,02 N larutan iodium = 1,761 mg Sefaleksin monohidrat

$$E = \frac{0,02145}{0,02000} \times 1,761 \text{ mg} = 1,88867 \text{ mg}$$

Penimbangan = 0,0501 g

$$\text{Kadar dalam 5,0 ml : } (B - A) \times \frac{N_{\text{Na.tio}} \times E}{N_{\text{Iod}}}$$

B = 11,35 ml

A = 8,60 ml

$$(11,35 - 8,60) \times \frac{0,0204 \times 1,88867}{0,0214}$$

Kadar dalam 5,0 ml = 4,94202 mg

$$\text{Kadar dalam 50,0 ml} = \frac{50,0 \text{ ml}}{5,0 \text{ ml}} \times 4,94202 \text{ mg} = 49,4202 \text{ mg} = 0,04942 \text{ g}$$

Kadar senyawa Sefaleksin dalam % b/b :

$$\frac{0,04942}{0,0501} \times 100 \% = 98,84 \%$$

LAMPIRAN 2

Contoh Perhitungan Penentuan Kadar Senyawa N-benzoil sefaleksin Dengan Metode Iodometri

Dari hasil penelitian diperoleh :

Normalitas Natrium tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) = 0,0200 N

Normalitas Iodium = 0,0214 N

Ekivalensi : Kesetaraan tiap ml 0,02 N larutan iodium = 1,761 mg Sefaleksin monohidrat

$$E = \frac{0,0214}{0,0200} \times 1,761 \text{ mg} = 1,88427 \text{ mg}$$

Penimbangan = 0,0502 g

Kadar dalam 5,0 ml :

$$(B - A) \times \frac{N_{\text{Na.tio}}}{N_{\text{Iod}}} \times E \times \frac{\text{BM}_{\text{N-benzoil sefaleksin}}}{\text{BM}_{\text{Sefaleksin monohidrat}}}$$

B = 10,25 ml

A = 8,05 ml

$$(10,25 - 8,05) \times \frac{0,0200}{0,0214} \times 1,88427 \times \frac{461,4}{365,4}$$

Kadar dalam 5,0 ml = 4,89205 mg

Kadar dalam 50,0 ml = $\frac{50,0 \text{ ml}}{5,0 \text{ ml}} \times 4,89205 \text{ mg} = 48,9205 \text{ mg} = 0,04892 \text{ g}$

Kadar senyawa N-benzoil sefaleksin dalam % b/b :

$$\frac{0,04892}{0,050} \times 100 \% = 97,84 \%$$

LAMPIRAN 3

Contoh perhitungan kadar senyawa pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Dari hasil penetapan kadar secara Iodometri :

1. Untuk 50 mg Sefaleksin mengandung senyawa Sefaleksin :

$$99,00 \% \times 50 \text{ mg} = 49,50 \text{ mg}$$

2. Untuk 50 mg N-benzoil sefaleksin mengandung senyawa N-benzoil sefaleksin :

$$98,16 \% \times 50 \text{ mg} = 49,08 \text{ mg}$$

A. Sefaleksin yang ditimbang :

$$\frac{100}{99,00} \times 0,050 \text{ g} = 0,05051 \text{ g} = 0,051 \text{ g}$$

→ mengandung senyawa Sefaleksin 0,05049 g, kemudian ditambah aquades sampai 25,0 ml

$$\text{Kadar senyawa Sefaleksin} : \frac{0,05049 \text{ g}}{25,0 \text{ ml}} = \frac{50,49 \text{ mg}}{25,0 \text{ ml}} = 2019,60 \text{ ppm}$$

Kemudian dibuat pengenceran : 1009,80 ppm; 504,90 ppm; 252,45 ppm dan 126,23 ppm

B. N-benzoil sefaleksin yang ditimbang :

$$\frac{100}{98,16} \times 0,050 \text{ g} = 0,05094 \text{ g} = 0,051 \text{ g}$$

→ mengandung senyawa Sefaleksin 0,05006 g, kemudian ditambahkan aquades sampai 25,0 ml

$$\text{Kadar senyawa Sefaleksin} : \frac{0,05006 \text{ g}}{25,0 \text{ ml}} = \frac{50,06 \text{ mg}}{25,0 \text{ ml}} = 2002,46 \text{ ppm}$$

Kemudian dibuat pengenceran : 1001,23 ppm; 500,62 ppm; 250,31 ppm dan 125,15 ppm

LAMPIRAN 4

Nilai r hitung dan F hitung dari senyawa Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin

No.	Bakteri	Sefaleksin		N-benzoilsefaleksin	
		r hitung	F hitung	r hitung	F hitung
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,977	63,079	0,990	140,964
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,962	36,864	0,969	46,585
3.	<i>Escherichia coli</i>	0,991	169,733	0,969	46,893

LAMPIRAN 5

Penentuan persamaan regresi Sefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa*
ATCC 9027

LAMPIRAN 6

Penentuan persamaan regresi N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

LAMPIRAN 7

Penentuan persamaan regresi Sefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	LOGKADA R ^a	,	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: DDHSSA2

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,962 ^a	,925	,900	1,41823

a. Predictors: (Constant), LOGKADAR

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	74,147	1	74,147	36,864	,009 ^a
	Residual	6,034	3	2,011		
	Total	80,181	4			

a. Predictors: (Constant), LOGKADAR

b. Dependent Variable: DDHSSA2

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-6,770	4,071		-1,663	,195
	LOGKADAR	9,046	1,490	,962	6,072	,009

a. Dependent Variable: DDHSSA2

LAMPIRAN 8

Penentuan persamaan regresi N-benzoilsefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	LOGKADA R ^a	,	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: DDHNSA2

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,969 ^a	,939	,919	1,27411

a. Predictors: (Constant), LOGKADAR

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	75,624	1	75,624	46,585	,006 ^a
	Residual	4,870	3	1,623		
	Total	80,494	4			

a. Predictors: (Constant), LOGKADAR

b. Dependent Variable: DDHNSA2

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-5,604	3,657		-1,532	,223
	LOGKADAR	9,135	1,338	,969	6,825	,006

a. Dependent Variable: DDHNSA2

LAMPIRAN 9

Penentuan persamaan regresi Sefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC
25922

LAMPIRAN 10

**Penentuan persamaan regresi N-benzoilsefaleksin terhadap *Escherichia coli*
ATCC 25922**

LAMPIRAN 11

Hasil perhitungan uji t variabel b (slope) senyawa Sefaleksin dengan N-benzoilsefaleksin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Replikasi	Persamaan regresi	
	Sefaleksin	N-benzoilsefaleksin
1.	$y = 1,412 x + 7,862$	$y = 3,754 x + 2,513$
2.	$y = 2,565 x + 3,456$	$y = 3,581 x + 2,671$
3.	$y = 2,109 x + 5,077$	$y = 3,873 x + 1,010$

No.	Sampel	N	x	S
1.	Sefaleksin	3	2,029	0,581
2.	N-benzoilsefaleksin	3	3,736	0,147

Keterangan :

N = jumlah replikasi

x = rata-rata slope

s = simpangan baku

$$Sp = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times (S_1)^2 + (n_2 - 1) \times (S_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} = \sqrt{\frac{(3 - 1) \times (0,581)^2 + (3 - 1) \times (0,147)^2}{3 + 3 - 2}}$$

$$Sp = 0,424$$

$$t_{hitung} = \frac{x_1 - x_2}{Sp \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{3,736 - 2,029}{0,424 \sqrt{\left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3}\right)}} = 4,931$$

Pada $\alpha = 0,05$ dan DB = 4 didapat t tabel = 2,776 \rightarrow t_{hitung} > t_{tabel}

Jadi ada perbedaan aktivitas antibakteri antara Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

LAMPIRAN 12

Hasil perhitungan uji t variabel b (slope) senyawa Sefaleksin dengan N-benzoilsefaleksin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Replikasi	Persamaan regresi	
	Sefaleksin	N-benzoilsefaleksin
1.	$y = 10,159 x - 8,975$	$y = 8,753 x - 3,973$
2.	$y = 9,129 x - 6,952$	$y = 9,763 x - 8,030$
3.	$y = 8,498 x - 5,931$	$y = 8,896 x - 4,824$

No.	Sampel	N	x	S
1.	Sefaleksin	3	9,262	0,838
2.	N-benzoilsefaleksin	3	9,138	0,547

Keterangan :

N = jumlah replikasi

x = rata-rata slope

s = simpangan baku

$$Sp = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times (S_1)^2 + (n_2 - 1) \times (S_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} = \sqrt{\frac{(3 - 1) \times (0,838)^2 + (3 - 1) \times (0,547)^2}{3 + 3 - 2}}$$

$$Sp = 0,708$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{x_1 - x_2}{Sp \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{9,138 - 9,262}{0,708 \sqrt{\left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3}\right)}} = 0,215$$

Pada $\alpha = 0,05$ dan DB = 4 didapat t table = 2,776 \rightarrow $t_{\text{hitung}} < t_{\text{tabel}}$

Jadi tidak ada perbedaan aktivitas antibakteri antara Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

LAMPIRAN 13

Hasil perhitungan uji t variabel b (slope) senyawa Sefaleksin dengan N-benzoilsefaleksin terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

Replikasi	Persamaan regresi	
	Sefaleksin	N-benzoilsefaleksin
1.	$y = 2,335 x + 5,613$	$y = 2,033 x + 7,443$
2.	$y = 1,907 x + 6,216$	$y = 2,757 x + 4,998$
3.	$y = 2,176 x + 5,179$	$y = 2,903 x + 3,866$

No.	Sampel	N	X	S
1.	Sefaleksin	3	2,139	0,216
2.	N-benzoilsefaleksin	3	2,564	0,466

Keterangan :

N = jumlah replikasi

x = rata-rata slope

s = simpangan baku

$$Sp = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times (S_1)^2 + (n_2 - 1) \times (S_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} = \sqrt{\frac{(3 - 1) \times (0,216)^2 + (3 - 1) \times (0,466)^2}{3 + 3 - 2}}$$

$$Sp = 0,363$$

$$t_{hitung} = \frac{x_1 - x_2}{Sp \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{2,139 - 2,564}{0,363 \sqrt{\left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3}\right)}} = 1,434$$

Pada $\alpha = 0,05$ dan DB = 4 didapat t table = 2,776 \rightarrow t_{hitung} < t_{tabel}

Jadi tidak ada perbedaan aktivitas antibakteri antara Sefaleksin dan N-benzoilsefaleksin.

LAMPIRAN 14

Harga r tabel

Harga r

DB	P	
	0,05	0,01
1	0,997	1,00
2	0,950	0,990
3	0,878	0,959
4	0,811	0,917
5	0,754	0,874
6	0,707	0,834
7	0,666	0,798
8	0,632	0,765
9	0,602	0,735
10	0,576	0,708
11	0,553	0,684
12	0,532	0,661
13	0,514	0,641
14	0,497	0,623
15	0,482	0,606
16	0,468	0,590
17	0,456	0,575
18	0,444	0,561
19	0,433	0,549
20	0,432	0,537

Dikutip dari :

Soedigdo S., Soedigdo P., 1977, Pengantar Cara Statika Kimia, Bandung ;
Penerbit ITB Bandung, hal. 42.

LAMPIRAN 15

Harga F tabel

Harga distribusi F tabel pada derajat kepercayaan 95 %

v_2	v_1								
	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	2,79	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
~	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88

Dikutip dari :

Richel, W.A., 1988, Handbook of Basic Pharmacokinetics, 3th Ed., Cincinate ;
Drug Intelegence Publication inc., p.315.

LAMPIRAN 16

Harga t tabel

Harga t

DB	P	
	0,025	0,05
1.	12,706	6,314
2.	4,303	2,920
3.	3,162	2,353
4.	2,776	2,132
5.	2,571	2,015
6.	2,447	1,943
7.	2,365	1,895
8.	2,306	1,860
9.	2,262	1,833
10.	2,228	1,812
11.	2,201	1,796
12.	2,179	1,782
13.	2,160	1,771
14.	2,145	1,761
15.	2,131	1,753
16.	2,120	1,746
17.	2,110	1,740
18.	2,101	1,734
19.	2,093	1,729
20.	2,086	1,725

Dikutip dari :

Bethea RM, Duran BS., Boullion T., 1985, Statistical Methods for Engineers and Scientists. 2nd Ed. Volume 57. Marcel Dekker, New York. pp. 624.

LAMPIRAN 17

Sertifikat Analisis Sefaleksin

LAMPIRAN 18

Sertifikat Analisis N-benzoilsefaleksin

LAMPIRAN 19

Surat Keterangan Bakteri Uji