



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENETAPAN KADAR AMPISILIN DI DALAM URIN
IN VITRO SECARA SPEKTROFOTOMETRI**

SKRIPSI

IMELDA PRIANA

0706197446

**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM EKSTENSI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENETAPAN KADAR AMPISILIN DI DALAM URIN
IN VITRO SECARA SPEKTROFOTOMETRI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

IMELDA PRIANA

0706197446

**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM EKSTENSI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

NAMA : IMELDA PRIANA

NPM : 0706197446

TANDA TANGAN :



TANGGAL : 21 JUNI 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Imelda Priana
NPM : 0706197446
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Penetapan Kadar Ampisilin di Dalam Urin *in Vitro* Secara Spektrofotometri

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Drs. Umar Mansur, M.Sc (.....
Pembimbing II : Santi Purna Sari, M.Si (.....
Penguji : Dra. Azizahwati, MS, Apt (.....
Penguji : Dr. Iskandarsyah, M.Si (.....
Penguji : Dra. Maryati K, M.Si (.....

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 19 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji serta syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada pihak-pihak yang telah memberi bimbingan, masukan serta dukungan kepada penulis selama menjalankan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

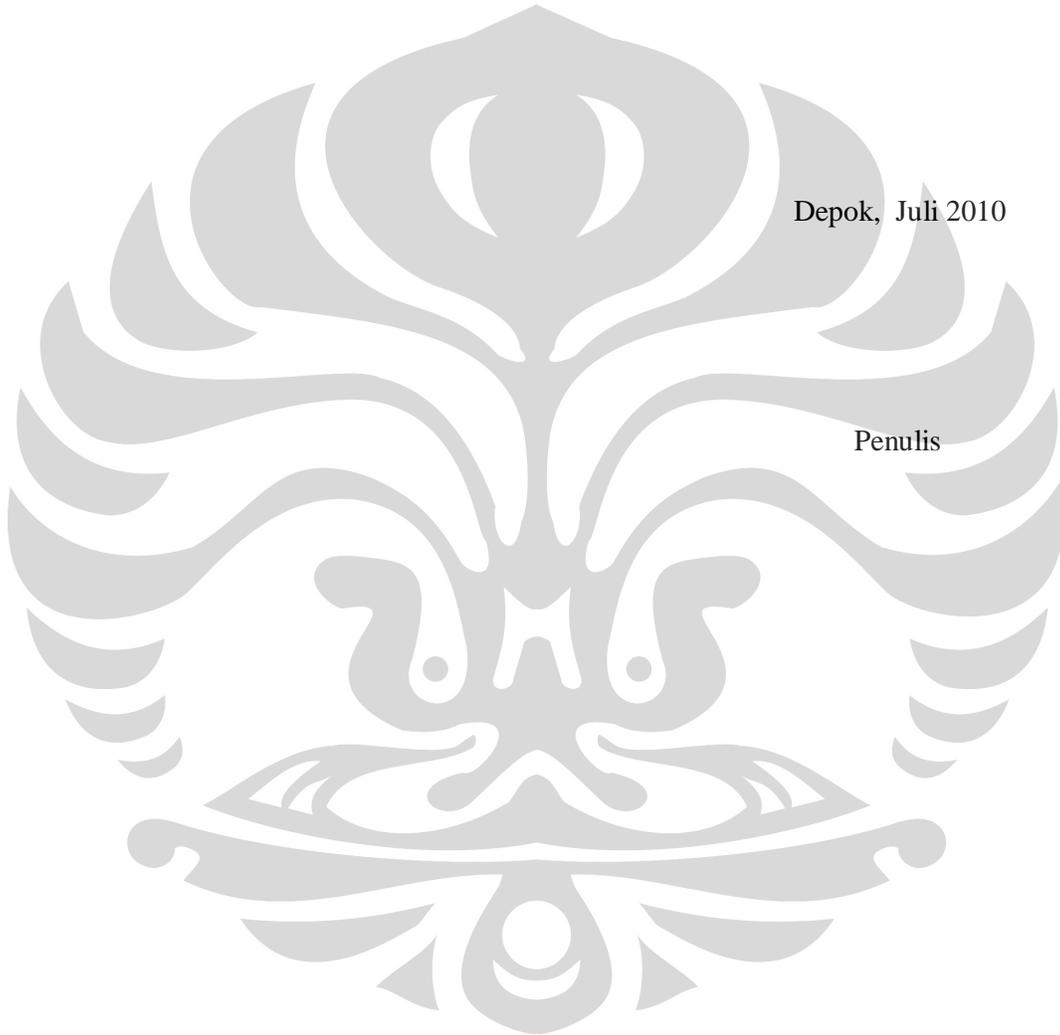
1. Bapak Drs. Umar Mansur, M.Sc selaku pembimbing I, yang telah bersedia memberikan waktu untuk bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Santi Purna Sari, M.Si selaku pembimbing II, yang telah bersedia memberikan waktu untuk bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S selaku Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini.
4. Bapak Dr. Abdul Mun'im M.S selaku Pembimbing Akademik dan Ketua Program Ekstensi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
5. Bapak Drs. Hayun, M.Si selaku Ketua Laboratorium Kimia Kuantitatif yang telah memberikan izin penggunaan tempat dan fasilitas yang ada di Laboratorium Kimia Kuantitatif.
6. Seluruh staf pengajar, laboran dan karyawan Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
7. Teriring cinta dan sayang untuk kedua orangtuaku, adikku "Dian" serta orang terkasih "Panji kokoh P" yang telah memberi semangat serta dukungan dalam pengerjaan skripsi ini.

8. Mba Indri yang selalu membantu dan memberi semangat sejak penelitian sampai penyusunan skripsi ini.
9. Teman-teman Ekstensi Farmasi FMIPA UI angkatan 2007 .

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, karena itu penulis mengharapkan saran serta kritik yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembacanya.

Depok, Juli 2010

Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Imelda Priana
NPM : 0706197446
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“ Penetapan Kadar Ampisilin di dalam Urin *in vitro* secara Spektrofotometri “
berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia / format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada Tanggal : 1 Juli 2010

Yang Menyatakan



(Imelda Priana)

Nama : Imelda Priana
Program Studi : Ekstensi Farmasi, Departemen Farmasi, Universitas Indonesia
Judul : Penetapan Kadar Ampisilin di dalam Urin *in vitro* secara Spektrofotometri

ABSTRAK

Ampisilin merupakan antibiotik golongan beta laktam, dikeluarkan dalam jumlah besar ($\pm 90\%$) melalui urin dalam bentuk utuh atau tidak berubah. Penetapan kadar ampisilin dalam urin umumnya dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), untuk itu perlu dikembangkan metode dengan alat yang lebih sederhana seperti spektrofotometri. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi penetapan kadar ampisilin dalam urin secara spektrofotometri. Ampisilin akan bereaksi dengan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat dalam larutan buffer fosfat pH 9,5 menghasilkan warna coklat tua jernih, yang dianalisis dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum 401 nm, dengan kondisi optimasi pH ± 9 dan lama reaksi 1 jam. Urin yang digunakan merupakan urin segar, agar tidak mempengaruhi stabilitas serapan. Pada kondisi optimum ini didapat nilai perolehan kembali dari hasil analisis sebesar 95,41 – 110,53%.

Kata kunci : Ampisilin, urin, spektrofotometri, natrium 1,2- naftoquinon-4-sulfonat
xii + 41 hlm; gbr; tab; lamp
bibliografi : 20 (1979-2008)

Name : Imelda Priana
Study Program : Extension Pharmacy, Pharmacy Department,
University of Indonesia
Title : Spectrophotometric determination of ampicillin in urine
in vitro

ABSTRACT

Ampicillin is an antibiotic of beta-lactam group, excreted in vast amount ($\pm 90\%$) as the non-deformed compound in human urine. Determination of ampicillin in human urine generally with high pressure liquid chromatography (HPLC) method, so that we need a research with simple method like spectrophotometry. The aim of this study is to know optimal determination of ampicillin in human urine with spectrophotometry. In this study, sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic in buffer phosphat solution pH 9,5 was used as reactant which will form the translucent dark brown colour when react with ampicillin, that can be analysis with visible spectrophotometer in wavelength 401 nm, with optimal condition pH ± 9 and time reaction 1 hour. The fresh urine used in analysis, to prevent unstability absorption. The recovery test gives 95,41 – 110,53% for ampicillin analysis in human urine.

Keyword : Ampicillin, human urine, spectrophotometry, sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic
xii + 41 pages; figure; tables: appendix
bibliografi : 20 (1979-2008)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Ampisilin Trihidrat	3
2.2 Urin	5
2.3 Spektrofotometri	7
2.4 Validasi Metode Analisis	9
3. METODE PENELITIAN	13
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	13
3.2 Alat	13
3.3 Bahan	13
3.4 Cara Kerja	13
3.5 Pengolahan Data	16
4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	17
4.2 Penentuan Lamanya Pendiaman Larutan Uji.....	17
4.3 Pembuatan kurva kalibrasi dan Pengujian Linieritas.....	17
4.4 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	18
4.5 Uji Akurasi.....	18
4.6 Uji Presisi.....	19
4.7 Uji Stabilitas dengan Metode Beku-cair.....	19
4.8 Uji Pengaruh Kesegaran Urin terhadap Serapan.....	20
4.9 Pengujian Menggunakan Pengawet.....	21
5. KESIMPULAN DAN SARAN	22
5.1 Kesimpulan	22
5.2 Saran	22
DAFTAR ACUAN	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur ampisilin trihidrat	26
Gambar 2.2	Reaksi antara ampisilin dengan sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic	26
Gambar 2.3	Degradasi Ampisilin.....	27
Gambar 4.1	Penentuan panjang gelombang maksimum	28
Gambar 4.2	Kurva kalibrasi analisa ampisilin dalam urin	28
Gambar 4.3	Serapan urin segar tanpa ampisilin.....	29
Gambar 4.4	Serapan urin tanpa ampisilin setelah dimasukkan frezer dengan blanko urin segar.....	29
Gambar 4.5	Serapan urin segar dengan ampisilin pada konsentrasi 106,8 ppm.....	30

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Penentuan lamanya pendiaman larutan uji pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin.....	31
Tabel 4.2	Data kurva kalibrasi penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi.....	32
Tabel 4.3	Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi pada penetapan kadar ampisilin didalam urin.....	33
Tabel 4.4	Hasil perhitungan akurasi pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi.....	34
Tabel 4.5	Hasil perhitungan presisi pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi.....	35
Tabel 4.6	Hasil perhitungan uji stabilitas dengan metode beku-cair pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi.....	36
Tabel 4.7	Pengaruh kesegaran urin terhadap serapan (dibuat larutan standar baru sesuai waktu pendiaman urin).....	36
Tabel 4.8	Perbandingan panjang gelombang dan serapan larutan uji yang diberi toluene dengan larutan uji tanpa toluene.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara menghitung batas deteksi dan batas kuantitasi.....	38
Lampiran 2	Cara menghitung simpangan baku dan koefisien variasi.....	39
Lampiran 3	Contoh spektrofotometer Jasco V-530.....	40
Lampiran 4	Sertifikat analisis standar ampisilin trihidrat.....	41



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antibiotik adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba jenis lain. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Antibiotik harus bersifat sangat toksis untuk mikroba tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (Gunawan, Setiabudy, Nafrialdi, Elysabeth, 2007).

Penggunaan terapeutik Antibiotik di klinik bertujuan membasmi mikroba penyebab infeksi, dimana penggunaannya ditentukan berdasarkan indikasi dengan memperhatikan faktor-faktor seperti gambaran klinik penyakit infeksi, yakni efek yang ditimbulkan oleh adanya mikroba dalam tubuh hospes dan bukan berdasarkan atas kehadiran mikroba tersebut semata-mata; efek terapi Antibiotik pada penyakit infeksi diperoleh hanya sebagai akibat kerja antimikroba dan tidak terhadap biomekanisme tubuh hospes; antibiotik dapat dikatakan bukan merupakan “obat penyembuh” penyakit infeksi dalam arti kata sebenarnya. Antimikroba hanyalah menyingkatkan waktu yang diperlukan tubuh hospes untuk sembuh dari suatu penyakit infeksi (Gunawan, Setiabudy, Nafrialdi, Elysabeth, 2007).

Salah satu antibiotik yang sering digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit adalah turunan Penisilin yaitu Ampisilin. Ampisilin merupakan golongan dari Aminopenisilin, tahan terhadap asam tetapi tidak tahan terhadap penisilinase dan spektrum antimikrobanya luas, oleh karena itulah ampisilin banyak digunakan dalam pengobatan penyakit infeksi (Gunawan, Setiabudy, Nafrialdi, Elysabeth, 2007).

Pengukuran terhadap lamanya suatu obat berada di dalam tubuh dapat dilakukan dengan mengukur kadar obat tersebut di dalam darah, atau

mengukur kadar obat yang dieksresi melalui urin. Pengukuran kadar obat dalam urin dapat dilakukan apabila obat tersebut diekskresikan melalui urin dalam jumlah yang besar dan menjadi metabolit aktif atau bentuk utuh (tidak berubah). Ampisilin merupakan antibiotik yang mengalami proses eliminasi melalui ginjal dan ekskresinya dalam urin besar ($\pm 90\%$) sebagai obat utuh atau tidak berubah, sehingga ampisilin dapat digunakan sebagai bahan dalam penelitian (Lacy, Armstrong, Goldman, Lance, 2007).

Metode yang sering digunakan untuk penetapan kadar ampisilin adalah dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), karena metode ini membutuhkan peralatan yang cukup rumit, maka perlu dikembangkan metode lain untuk penetapan kadar ampisilin menggunakan peralatan yang lebih sederhana seperti spektrofotometer.

Dalam penelitian penetapan kadar ampisilin di dalam urin, ditentukan kondisi optimum untuk menganalisis secara kuantitatif kadar ampisilin di dalam urin. Metode yang akan digunakan untuk menganalisis ampisilin yang terdapat dalam urin adalah spektrofotometri. Berdasarkan penelitian sebelumnya tentang penetapan kadar ampisilin dalam medium air menggunakan pereaksi natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat secara spektrofotometri (Lixiao, Huaiyou, Yan, 2004), maka pada penelitian ini mencoba untuk melakukan penetapan kadar ampisilin di dalam urin menggunakan metode tersebut.

Untuk membuktikan bahwa penetapan kadar ampisilin di dalam urin *in vivo* menggunakan pereaksi natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat secara spektrofotometri dapat digunakan, maka perlu dilakukan uji pendahuluan yaitu penetapan kadar ampisilin di dalam urin *in vitro* secara spektrofotometri.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan menentukan kondisi optimum penetapan kadar ampisilin di dalam urin *in vitro* menggunakan pereaksi natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat secara spektrofotometri.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ampisilin Trihidrat

2.1.1 Sifat Fisikokimia

Ampisilin trihidrat mempunyai rumus molekul $C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$ dengan berat molekul 403,5. Berupa serbuk kristal berwarna putih, sedikit larut dalam air, praktis tidak larut dalam alkohol dan minyak lemak. pH larutan dalam air bebas CO_2 berkisar 3,5 – 5,5. Dapat larut dengan penambahan larutan asam dan hidroksi alkali. Penyimpanan dalam wadah kedap udara, temperatur tidak lebih dari $30^\circ C$ (British Pharmacopoeia 2007, 2006 ; Martindale 35, 2007).

2.1.2 Mekanisme Kerja

Mekanisme kerja antibiotik betalaktam adalah : obat bergabung dengan *penicillin-binding protein* (PBPs) pada kuman, terjadi hambatan sintesis dinding sel kuman karena proses transpeptidasi antara rantai peptidoglikan terganggu, kemudian terjadi aktivasi enzim proteolitik pada dinding sel kuman (Gunawan, Setiabudy, Nafrialdi, Elysabeth, 2007).

2.1.3 Fungsi dan Efek Klinis

Ampisilin merupakan prototip golongan amino-penisilin berspektrum luas, stabil dalam asam dan lebih efektif terhadap bakteri gram-negatif. Semua penisilin golongan ini dirusak oleh betalaktamase yang diproduksi kuman Gram-positif maupun kuman Gram-negatif (Katzung, 1989). Kuman *meningokokus*, *pneumokokus*, *gonokokus*, dan *L. monocytogenes* sensitif terhadap terhadap ampisilin (Gunawan, Setiabudy, Nafrialdi, Elysabeth, 2007).

Ampisilin diindikasikan untuk infeksi saluran kemih, otitis media, sinusitis, bronkitis kronis, salmonellosis invasive, gonore. Peringatan yang perlu diperhatikan adalah adanya riwayat alergi, gangguan fungsi ginjal,

lesi eritmetous pada glandular vefer, leukemia limfositik kronik dan AIDS (Sukandar, Andrajati, Sigit, Adnyana, Setiadi, Kusnandar, 2008).

2.1.4 Degradasi Ampisilin

Adanya enzim penisilinase yang bersifat basa dan spesifik, kerjanya selektif yaitu hanya menyerang cincin β - laktam untuk menghasilkan asam penisiloat. Pada pemanasan, asam penisiloat dengan mudah melepaskan CO_2 , melengkap pembentukan asam penisiloat yang sesuai, dengan adanya HgCl_2 menghasilkan penisilamin dan peniloaldehyd.

Dalam larutan asam encer (pH 4,0) pada suhu kamar, penisilin mengalami tata ulang intramolekular dan diubah menjadi asam penilat. Dari pandangan klinis, perubahan penisilin yang paling nyata disebabkan oleh asam lambung dan enzim mikroba yang biasanya disebut penisilinase. Asam kuat lambung menyebabkan hidrolisis cincin samping amida dan membuka cincin β -laktam yang menyebabkan hilangnya aktivitas antimikroba (Foye, 1996).

2.1.5 Farmakokinetik

Sebanyak 50% ampisilin diabsorpsi pada pemakaian per oral (Lacy, et al.2007). Jumlah ampisilin yang diabsorpsi pada pemberian oral dipengaruhi besarnya dosis dan ada tidaknya makanan dalam saluran cerna. Adanya makanan dalam saluran cerna akan menghambat absorpsi obat (Gunawan, Setiabudy, Nafrialdi, Elysabeth, 2007).

Ampisilin di distribusi luas di dalam tubuh dan ikatan obat dengan protein sekitar 15% - 25%. Ampisilin umumnya diekskresi melalui proses sekresi di tubuli ginjal, banyaknya jumlah ampisilin yang diekskresikan melalui urin sekitar 90% sebagai obat utuh atau obat tidak berubah. Masa paruh eliminasi dari ampisilin adalah 1-1,8 jam tetapi masa paruh eliminasi ini dapat diperpanjang oleh adanya obat lain (Lacy, Armstrong, Goldman, Lance, 2007).

2.1.6 Analisis

Ampisilin dapat dianalisis dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi, spektrofotometri, spektrofluorimetri, kolorimetri, kapilari elektroforesis (Farmakope Indonesia Edisi 4, 1995)

Metode analisis yang digunakan dalam penelitian adalah spektrofotometri dengan menggunakan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat. Natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat dalam larutan suasana basa akan bereaksi dengan amino dari ampisilin kemudian membentuk senyawa berwarna pink salmon, yang kemudian dapat diukur pada panjang gelombang 463 nm (Lixiao, Huaiyou, Yan, 2004).

2.2 Urin

Organ yang berperan dalam pembentukan urin adalah ginjal. Salah satu fungsi ginjal yang terpenting adalah membersihkan tubuh dari sisa-sisa hasil pencernaan atau yang dihasilkan dari proses metabolisme, dengan cara mengekskresikannya ke dalam urin, sementara zat yang masih dibutuhkan oleh tubuh dikembalikan lagi ke dalam darah.

Karakteristik fisik urin :

- **Warna dan kejernihan**
Urin segar terlihat jernih dan sedikit berwarna kuning muda. Warna kuning berasal dari urokrom, pigmen hasil dari destruktif hemoglobin dari dalam tubuh (melalui bilirubin atau zat warna empedu)
- **Bau**
Urin segar memiliki bau sedikit aromatik, tetapi jika dibiarkan akan menghasilkan bau ammonia akibat perusakan atau metabolisme urea oleh bakteri. Beberapa obat dan makanan biasanya memberikan bau pada urin, begitu juga jika terjadi infeksi atau gangguan di dalam tubuh.
- **pH**
pH urin biasanya sedikit asam (\pm pH 6), tetapi dapat berubah akibat metabolisme atau makanan menjadi sekitar 4,8 – 8,0. Banyak mengkonsumsi makanan tinggi protein dan bersifat asam akan

menghasilkan pH urin menjadi asam. Jika banyak mengonsumsi sayuran dan adanya infeksi bakteri pada saluran kemih akan menyebabkan pH urin menjadi basa.

- **Berat Jenis**

Karena komponen urin sebagian besar adalah air dan sedikit zat terlarut hasil metabolisme, maka berat jenis urin hampir sama dengan berat jenis air (air destilasi). Berat jenis air destilasi adalah 1,0 dan berat jenis urin sekitar 1,001 – 1,035 tergantung dari konsentrasi zat terlarut di dalamnya hasil metabolisme. (Marieb, Hoehn, 2006)

Komposisi dari urin hampir 95% adalah air dan 5% adalah zat-zat terlarut hasil metabolisme. Komponen terbesar dalam urin berdasarkan beratnya adalah air, lalu ada urea yang didapat dari hasil pecahnya asam amino. Nitrogen lain yang dibuang bersama dalam urin termasuk asam urat (produk akhir dari metabolisme asam nukleat) dan kreatinin (metabolit dari keratin fosfat). Zat terlarut yang terdapat dalam urin adalah urea, Na^+ , K^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , kreatinin dan asam urat. Zat terlarut yang jumlahnya sangat kecil, tetapi ada dalam urin antara lain Ca^{2+} , Mg^{2+} , and HCO_3^- . (Guyton, 1995 ; Marieb, Hoehn, 2006)

Untuk melakukan pemeriksaan kandungan zat dalam urin maka diperlukan sampel urin. Sampel urin ada beberapa macam yaitu :

- **Urin Pagi** , yaitu urin yang dikeluarkan pertama-tama pada pagi hari setelah bangun tidur. Sifat urin ini adalah pekat. Dipakai untuk pemeriksaan sedimen, berat jenis, protein serta reaksi biologi misalnya test kehamilan.
- **Urin Sewaktu** , yaitu urin yang dikeluarkan pada satu waktu yang tidak ditentukan dengan khusus. Sifatnya lebih encer dari urin pagi dan biasa digunakan untuk pemeriksaan rutin.
- **Urin Post Prandial** , yaitu urin yang dikeluarkan pertama kali setelah 1-3 jam sesudah makan. Digunakan untuk pemeriksaan kadar gula (test reduksi) sebagai pemeriksaan penyaring untuk glukosuria.

- **Urin 24 Jam** , yaitu urin yang dikeluarkan selama 24 jam, misal urin mulai jam 7 pagi sampai jam 7 pagi keesokan harinya. Digunakan untuk mengukur diuresis per menit, menentukan secara kuantitatif kadar suatu zat dalam urin.
- **Urin 3 Gelas atau 2 Gelas Pada Pria.** Digunakan untuk menentukan letak infeksi atau lesi pada saluran urin bagian distal pada pria (Kosasih, 2008).

Untuk mengumpulkan sampel urin diperlukan suatu wadah yang memenuhi syarat : harus bersih dan kering (untuk pemeriksaan bakteriologi wadah harus steril) ; bermulut lebar dan dapat ditutup dengan rapat ; pada wadah urin sebaiknya dicantumkan etiket yang berisikan nama penderita, tanggal pengambilan sampel urin, jenis urin serta pengawet yang digunakan.

Pengawet yang biasa digunakan untuk mengawetkan urin adalah toluene, timol, HCl pekat, asam asetat glasial, Na_2CO_3 , asam sulfat pekat dan formaldehida 40% (Kosasih, 2008).

2.3 Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah cara penetapan berdasarkan pengukuran sinar dengan panjang gelombang terbatas yang hampir monokromatis yang diserap oleh zat dalam bentuk larutan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer. Spektrofotometer digunakan untuk mengukur besarnya energi yang diabsorpsi/diteruskan, jika radiasi yang monokromatik melewati larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap, maka radiasi ini akan dipantulkan, diabsorpsi oleh zatnya dan sisanya ditransmisikan (Harmita, 2006).

$$I_o = I_r + I_a + I_t$$

pengaruh I_r dapat dihilangkan dengan menggunakan blanko/kontrol, sehingga :

$$I_o = I_a + I_t$$

Hukum Lambert – Beer :

$$A = \log I_o / I_t = \gamma \cdot b \cdot c = a \cdot b \cdot c$$

dimana : A = serapan

- I_o = Intensitas sinar yang datang
 I_t = Intensitas sinar yang diteruskan
 γ = absorbtivitas molekul (mol.cm.L^{-1})
 a = daya serap (g.cm.L^{-1})

 b = tebal larutan atau tebal kuvet
 c = konsentrasi (g.L^{-1} atau mg.ml^{-1})

Spektrofotometer ada bermacam – macam, yaitu spektrofotometer uv-vis, spektrofotometer infra merah, spektrofotometer fluoresensi dan spektrofotometer serapan atom.

Jenis spektrofotometer ada 2, yaitu *single beam* dan *double beam*. Spektrofotometer *single beam* adalah spektrofotometer yang mempunyai satu spektrum atau satu sumber cahaya yaitu UV atau Visibel, sinar dari sumber cahaya langsung dipancarkan melalui satu berkas, untuk pemeriksaan harus dilakukan satu persatu secara bergantian sehingga tidak dapat diperiksa secara bersamaan antara larutan blanko dengan larutan standar atau dengan larutan sampel. Sedangkan spektrofotometer *double beam* adalah spektrofotometer yang mempunyai dua spektrum atau sumber cahaya yaitu UV dan Visibel, sinar dari sumber cahaya dibagi menjadi dua berkas yang dilewatkan melalui kuvet berisi larutan blanko dan kuvet yang berisi larutan standar atau larutan sampel, sehingga dapat diperiksa secara bersamaan.

Spektrum serapan adalah kurva hubungan antara serapan terhadap panjang gelombang. Faktor – faktor yang mempengaruhi spektrum serapan :

- Jenis pelarut (polar, non polar)
- pH larutan
- Kadar larutan, jika konsentrasi tinggi akan terjadi polimerisasi yang menyebabkan panjang gelombang (λ) maksimum berubah sama sekali atau harga $I_o \square I_a$
- Tebal larutan, jika digunakan kuvet dengan tebal berbeda akan memberikan spektrum serapan yang berbeda

- Lebar celah, makin lebar celah (slit width) maka makin lebar pula serapan (band width), cahaya makin polikromatis, resolusi dan puncak – puncak kurva tidak sempurna.

2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode bioanalisis meliputi semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode yang digunakan untuk menetapkan kadar analit dalam matrik biologis seperti plasma, darah, serum atau urin dapat dipercaya dan dapat dipertanggung jawabkan. Metode analisis ini sering dimodifikasi agar sesuai dengan kondisi laboratorium. Hasil modifikasi ini harus divalidasi untuk menjamin kinerja metode analisis tersebut dan dalam program pengembangan obat selama ini sering dilakukan modifikasi pada metode bioanalisis. (Department of Health and Human Service, 2001).

2.4.1 Kecermatan (Akurasi)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistemik di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistemik tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu dan pelaksanaan yang cermat. (Harmita, 2004)

Akurasi ditetapkan dengan cara menganalisis secara berulang sampel yang mengandung analit dengan kadar tertentu. Pengukuran akurasi ini dilakukan minimum 5 kali pada setiap konsentrasi dan sedikitnya terdapat 3 konsentrasi yang berbeda. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali analit yang ditambahkan dengan syarat nilai persyaratan perolehan kembali antara 80 – 120 % pada bioanalisis. Simpangan baku

rata-rata dari nilai yang sebenarnya menunjukkan akurasi dari metode dengan syarat tidak boleh lebih dari 15% kecuali pada batas kuantitasi kurang dari 20%. (Department of Health and Human Service, 2001).

Kecermatan dapat dilakukan dengan cara adisi, yaitu dengan cara menambahkan beberapa konsentrasi analit (minimal 3) pada sampel, kemudian masing-masing sampel dan sampel tanpa penambahan dianalisis. Setelah dibuat kurva regresi linier antara respon detektor dan jumlah analit yang ditambahkan, maka konsentrasi analit pada sampel dapat ditentukan dengan perpotongan pada sumbu x.

2.4.2 Keseksamaan (Presisi)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil uji individual rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran matriks biologis yang homogen. (Harmita, 2004)

Pengujian presisi menggunakan minimum 5 kali pengulangan pada setiap konsentrasi sampel dan menggunakan minimum 3 konsentrasi yang berbeda. Ukuran keseksamaan adalah simpangan baku relative dari setiap pengulangan dengan syarat tidak boleh lebih dari 15% kecuali pada batas kuantitasi kurang dari 20%. (Department of Health and Human Service, 2001).

2.4.3 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi adalah hubungan antara respon instrument dengan konsentrasi tertentu analit. Kurva kalibrasi harus mewakili analit dalam sampel. Kurva kalibrasi harus dibuat dalam matriks biologis yang sama dengan menambahkan matriks dengan sejumlah tertentu analit, yang diketahui konsentrasinya. Kurva kalibrasi harus dibuat dari enam hingga delapan konsentrasi larutan yang berbeda, yang mencakup konsentrasi analit dalam sampel.

Hubungan yang baik dan proporsional antara respon instrument dan konsentrasi analit dilihat dengan parameter linieritas. Linieritas adalah

kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linier, digunakan hubungan korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier diperoleh bila $r = +1$ atau -1 .

2.4.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi diartikan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama. (Harmita, 2004). Konsentrasi terendah pada kurva kalibrasi dari sampel biologik dapat diterima sebagai batas kuantitasi apabila respon analit pada konsentrasi tersebut 5 kali lebih kuat dibandingkan dengan respon blanko dan kadar puncak analit harus dapat diidentifikasi, dapat dibedakan dan mempunyai ketertiruan dengan presisi 20% dan akurasi 80-120%. (Department of Healt and Human Service, 2001).

2.4.5 Stabilitas

Stabilitas obat dalam cairan biologis harus ditentukan dan tergantung pada kondisi penyimpanan, sifat kimia obat, jenis matriks dan wadah sebagai tempat penyimpanan. Stabilitas analit dalam suatu matriks dan wadah tertentu hanya berlaku untuk matriks dan wadah tersebut dan tidak dapat dapat disamakan dengan matriks maupun wadah lain. Prosedur pengujian stabilitas mempunyai seluruh evaluasi kestabilan analit mulai dari pengumpulan contoh sampai penanganannya, penyimpanan jangka panjang (penyimpanan pada suhu rendah atau freezer) dan penyimpanan jangka pendek (pada suhu kamar), saat membeku dan mencair kembali, dan selama melakukan analisis. (Department of Healt and Human Service, 2001).

Kondisi pengujian stabilitas harus sama seperti pada saat melakukan analisis sampel sebenarnya. Evaluasi stabilitas juga harus dilakukan pada larutan induk.



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA UI Depok selama lebih kurang 2 (dua) bulan yaitu dari bulan April sampai Mei 2010.

3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer uv-vis (Jasco v-530), pH meter (Cyberscan), timbangan analitik (GR-202, AND), alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini :

- a. Spesimen urin sewaktu, diperoleh dari relawan wanita berusia 24 tahun yang tidak mengkonsumsi obat-obatan selama proses sampling dilakukan
- b. Bahan uji yang digunakan adalah Ampisilin trihidrat (Kimia Farma)
- c. Bahan kimia seperti natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat (Merck), natrium lauril sulfonat (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), NaOH (Brataco), etanol (Merck), aqua demineralisata.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan larutan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat 0,2% (w/v)

Natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat sebanyak 0,2 gram, dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan sedikit air bebas CO_2 lalu diaduk hingga melarut sempurna kemudian volume dicukupkan dengan air hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan dapat stabil selama dua minggu jika disimpan pada suhu 4°C .

3.4.2 Pembuatan larutan natrium lauril sulfonat 0,1% (w/v)

Natrium lauril sulfonat sebanyak 0,1 gram, dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan sedikit air bebas CO₂ lalu diaduk hingga melarut sempurna kemudian volume dicukupkan dengan air hingga tanda batas dan dihomogenkan.

3.4.3 Pembuatan larutan buffer fosfat pH 9,5 (Na₂HPO₄– NaOH)

a. Na₂HPO₄ 0,5 mol/L

Na₂HPO₄ sebanyak 6,70175 gram, dimasukkan dalam labu ukur 50 ml, ditambahkan sedikit air bebas CO₂ dan diaduk hingga melarut sempurna kemudian volume dicukupkan dengan air hingga tanda batas dan dihomogenkan.

b. NaOH 2N

NaOH sebanyak 2 gram, dimasukkan dalam labu 25 ml, tambahkan sedikit air bebas CO₂ dan aduk hingga melarut sempurna kemudian cukupkan volume dengan air hingga tanda batas dan dihomogenkan.

Pembuatan buffer dilakukan dengan menambahkan sejumlah larutan NaOH 2 N ke dalam larutan Na₂HPO₄ 0,5 mol/L hingga didapat pH larutan adalah 9,5.

3.4.4 Pembuatan larutan uji

a. Penyiapan larutan sampel

Ampisilin trihidrat standar sebanyak 50 mg, dimasukkan dalam labu ukur 50 ml, ditambahkan sedikit urin dan diaduk hingga melarut sempurna, kemudian volume dicukupkan dengan urin hingga tanda batas dan labu ukur dibolak-balik untuk dihomogenkan. Larutan ini merupakan larutan standar, untuk membuat bermacam-macam konsentrasi pada larutan sampel, dibuat dengan memipet larutan standar ini.

b. Preparasi larutan sampel yang akan diuji

Larutan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat 0,2% sebanyak 1,0 ml , dimasukkan dalam labu ukur 10 ml. 0,1 ml etanol dan 0,7 ml larutan natrium lauril sulfonat 0,1% ditambahkan kedalamnya kemudian dihomogenkan. 1,0 ml larutan sampel (hasil pemipetan dari larutan standar) dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan 2,0 ml larutan buffer pH 9,5 , lalu diaduk hingga homogen terakhir volume dicukupkan dengan menggunakan urin yang tidak mengandung ampisilin hingga tanda batas lalu dihomogenkan kembali.

c. Preparasi larutan blanko

Larutan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat 0,2% sebanyak 1,0 ml, dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml. 0,1 ml etanol dan 0,7 ml larutan natrium lauril sulfonat 0,1% ditambahkan kedalamnya lalu dihomogenkan, ditambahkan 2,0 ml larutan buffer pH 9,5 , kemudian diaduk hingga homogen terakhir volume dicukupkan dengan menggunakan urin yang tidak mengandung ampisilin hingga tanda batas lalu diaduk kembali hingga homogen.

3.4.5 Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan uji terlebih dahulu dibuat dengan konsentrasi 100 ppm yang didapat dari hasil pemipetan pada larutan standar dan larutan blanko disiapkan. Serapan diukur dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis yang telah diatur oleh larutan blanko, dan dilihat panjang gelombang maksimumnya.

3.4.6 Penentuan lamanya pendiaman larutan uji sebelum dilakukan analisis

Larutan uji dibuat dengan konsentrasi 100 ppm dan larutan blanko disiapkan. Analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis yang telah diatur oleh larutan blanko pada panjang gelombang maksimum dan dilakukan pengukuran larutan uji setiap 15 menit. Perbedaan serapan dari waktu ke waktu dilihat dan dicatat, pengukuran

dinyatakan selesai jika serapan telah konstan atau menjadi turun, kemudian dicatat waktu optimum untuk mendapatkan serapan maksimum.

3.4.7 Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan uji dibuat dengan berbagai konsentrasi (100 ; 120 ; 140 ; 160 ; 180 dan 200 ppm) dan larutan blanko disiapkan. Serapan diukur dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis yang telah diatur oleh larutan blanko pada panjang gelombang maksimum. Serapan dari masing-masing konsentrasi dicatat dan dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dengan serapan.

3.4.8 Prosedur uji stabilitas

Larutan uji dibuat dengan berbagai konsentrasi dan larutan blanko disiapkan. Serapan diukur dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis yang telah diatur oleh larutan blanko pada panjang gelombang maksimum. Larutan uji dan larutan blanko yang belum diberi pereaksi dimasukkan ke dalam freezer selama 24 jam, kemudian larutan uji dan larutan blanko dikeluarkan dari freezer dan biarkan larutan tersebut mencair sampai suhu kamar. Larutan uji dibuat dengan berbagai konsentrasi lalu direaksikan dengan pereaksi natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat dan didiamkan selama 1 jam (waktu yang diperlukan untuk bereaksi) lalu serapan diukur dengan spektrofotometer uv-vis yang telah diatur oleh larutan blanko pada panjang gelombang maksimum. Prosedur ini dilakukan selama 3 hari berturut-turut. Serapan yang terbaca dari masing-masing konsentrasi dicatat dari mulai belum dimasukkan dalam freezer sampai yang sudah dikeluarkan dari freezer. Perbedaan serapan masing-masing konsentrasi dihitung dari awal pengujian hingga akhir pengujian.

3.5 Pengolahan Data

Data diolah untuk menentukan kurva kalibrasi, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, koefisien variasi dan nilai perolehan kembali.

BAB 4

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pada awal penelitian, dicari panjang gelombang maksimum untuk analisis ampisilin dalam sampel urin. Berdasarkan kurva serapan yang dibuat, panjang gelombang maksimum yang didapat adalah 401 nm, dengan urin tanpa ampisilin sebagai blanko. Penetapan kadar dilakukan pada panjang gelombang maksimum, karena pada panjang gelombang maksimum diperoleh serapan maksimum, dimana perubahan serapan karena konsentrasi juga maksimum, sehingga menghasilkan kepekaan dan keakuratan yang tinggi. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.1.

4.2 Penentuan Lamanya Pendiaman Larutan Uji

Penentuan berapa lama larutan uji dibiarkan bereaksi dengan pereaksi natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat telah dilakukan dan didapat waktu yang paling baik untuk pendiamannya adalah 1 jam dengan batas keterlambatan pengukuran paling lama 15 menit. Lewat dari waktu tersebut serapan menjadi menurun. Penentuan lamanya reaksi yang terjadi dalam larutan uji untuk memberikan serapan maksimum yang stabil. Dari hasil pengamatan terdapat kesalahan dalam penentuan waktu pendiaman larutan uji, waktu mulai dihitung sejak ampisilin direaksikan dengan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat, bukan setelah larutan uji dibuat menjadi 10 ml. Keterlambatan sekitar 1 menit untuk masing-masing larutan uji, dan dapat dianggap tidak memberikan hasil yang jauh berbeda atau tidak signifikan. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

4.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Pengujian Linieritas

Dari hasil penelitian didapat persamaan garis untuk penetapan kadar ampisilin dalam urin adalah $y = 0,128842 + 0,000446x$ dengan koefisien korelasi, $r = 0,973669$. Pembuatan kurva kalibrasi, tujuannya untuk

mengetahui linieritas hubungan antara konsentrasi ampisilin dengan serapan yang dihasilkan. Nilai koefisien korelasi dari penelitian ini tidak terlalu linier, hal ini dapat dikarenakan oleh adanya reaksi antara komponen urin dengan ampisilin dan juga komponen urin (urea, kreatinin, gugus amino) yang ikut bereaksi dengan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat yang dapat mengganggu nilai serapan. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Tabel 4.2.

4.4 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi pada penetapan kadar ampisilin dalam urin yaitu 31,4524 ppm dan 104,8412 ppm. Hasil batas deteksi dan batas kuantitasi didapat dari perhitungan menggunakan persamaan garis yang didapat pada kurva kalibrasi. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.5 Uji Akurasi

Dari hasil penelitian didapat nilai perolehan kembali untuk analisa ampisilin masih masuk dalam batas antara 80 – 120%. Nilai UPK untuk masing-masing konsentrasi yaitu 106,8 ppm (UPK rata-rata = 103,39% ; kv = 6,02%), 128,16 ppm (UPK rata-rata = 102,91% ; kv = 3,19%), 149,52 ppm (UPK rata-rata = 97,63% ; kv = 3,27%), 170,88 ppm (UPK rata-rata = 108,08% ; kv = 1,36%), 192,24 ppm (UPK rata-rata = 104,27% ; kv = 2,95%). Nilai perolehan kembali pada penelitian ini hampir sebagian besar nilainya lebih dari 100%, hal ini disebabkan karena komponen dari urin (urea, kreatinin, gugus amino) ikut bereaksi dengan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat sehingga nilai serapan menjadi bertambah. Lamanya penyiapan larutan uji juga mempengaruhi perubahan nilai serapan, karena urin yang dibiarkan terlalu lama akan menjadi rusak yaitu berubahnya ureum menjadi amonia, dimana natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat dapat bereaksi dengan gugus amin maupun gugus amino yang terdapat dalam urin, menghasilkan senyawa berwarna yang ikut memberikan serapan pada saat analisis dengan panjang gelombang yang

hampir sama. Urin yang dibiarkan dan terkena udara akan mengalami oksidasi yaitu urobilinogen menjadi urobilin mengakibatkan warna urin menjadi lebih gelap, hal ini juga akan mempengaruhi warna serta hasil serapan analisis (Murray, Granner, Rodwell, 2006). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.4.

4.6 Uji Presisi

Dari hasil penelitian didapat nilai koefisien variasi dari berbagai konsentrasi yaitu 106,8 ppm (kv = 2,6%) ; 128,16 ppm (kv = 3,35%) ; 149,52 ppm (kv = 2,58%) ; 170,88 ppm (kv = 0,67%) ; 192,24 ppm (kv = 1,88%). Hasil pengujian presisi memenuhi syarat yaitu koefisien variasi tidak lebih dari 15%. Pengujian presisi menunjukkan bahwa prosedur yang dilakukan berulang kali pada suatu analisis memberikan hasil yang sama atau tidak jauh berbeda. Semakin besar nilai koefisien variasi dari uji presisi suatu analisis, menunjukkan bahwa prosedur tersebut tidak dapat digunakan untuk analisis, karena akan didapat hasil yang berbeda pada setiap analisis. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.7 Uji Stabilitas Dengan Metode Beku – Cair

Dari hasil uji stabilitas diketahui adanya perubahan serapan dari satu siklus ke siklus berikutnya. Serapan dari hasil analisis berubah menjadi lebih besar dari mulai analisa pertama sampai analisa siklus terakhir. Pada konsentrasi 42,75 ppm didapat hasil persentase perbedaan serapan dari siklus 1-3 yaitu 29,67%, 55,90%, 100,70% ; konsentrasi 106,88 ppm didapat hasil persentase perbedaan serapan dari siklus 1-3 adalah 6,39%, 22,56%, 70,70% ; konsentrasi 160,32 ppm didapat hasil persentase perbedaan serapan dari siklus 1-3 adalah 14,61%, 18,81%, 64,18%. Ketidak stabilan ini dapat disebabkan karena pH urin yang berubah menjadi lebih basa jika disimpan terlalu lama menyebabkan perubahan ureum menjadi amonia yang dapat ikut bereaksi dengan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat, pada suhu rendah asam urat dan garam urat dari

hasil metabolisme tubuh akan mengendap, endapan ini yang dapat menghalangi sinar pada spektrofotometri sehingga sinar tersebut sedikit yang diteruskan dan akibatnya nilai serapan menjadi lebih besar. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6

4.8 Uji Pengaruh Kesegaran Urin Terhadap Serapan

Dari hasil penelitian didapat bahwa semakin lama urin dibiarkan kemudian diberi ampisilin sesuai waktu dari mulai urin dikumpulkan, maka hasil pengujian menunjukkan serapan akan bertambah besar, kemudian serapan menjadi turun mendekati nol. Hal tersebut dapat terjadi akibat kontaminasi kuman pada saat dilakukan sampling dan pendiaman urin, sehingga berubahnya susunan kimia dalam urin, pH urin berubah menjadi lebih basa dan terjadi endapan-endapan dari komponen urin yang dapat mengganggu proses analisis, dimana sinar akan dihambat oleh endapan tersebut dan akhirnya serapan menjadi meningkat, selain itu terjadinya reaksi-reaksi antara komposisi urin dengan pereaksi natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat yang dapat meningkatkan serapan pada saat analisis. Hasil dari pengujian ini menunjukkan bahwa penetapan kadar ampisilin dalam urin dapat memberikan hasil, jika urin yang digunakan adalah urin yang segar, artinya urin baru saja diambil dan tidak terkontaminasi kuman ataupun zat-zat lain. Hal yang paling mendasar yang menyebabkan nilai serapan berbeda – beda dari tiap penelitian adalah sampel urin yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan sampel urin sewaktu, dimana pada hasil penelitian tidak didapat hasil yang baik karena komposisi urin tiap waktu tidak sama yang akan menyebabkan perbedaan warna larutan dan hasil serapan berubah-ubah. Karena itu sampel urin yang paling baik untuk digunakan dalam penetapan kadar suatu obat atau zat dalam urin adalah sampel urin 24 jam, dimana komposisi urinnya hampir sama dari waktu ke waktu. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7.

4.9 Pengujian Menggunakan Pengawet

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar ampisilin dalam urin, dimana urin yang digunakan adalah sampel urin sewaktu yang segar dan tidak diberi pengawet. Percobaan menggunakan pengawet untuk urin pernah dilakukan menggunakan toluen, tetapi hasil yang didapat tidak baik, dimana panjang gelombang maksimum untuk analisa berubah menjadi 430 nm. Hal ini disebabkan karena toluen memiliki gugus khromofor yang dapat menyerap sinar pada panjang gelombang tertentu dan jika digunakan bersamaan dalam analisa ini akan mengganggu serapan dan berubahnya panjang gelombang maksimum yang didapat. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Pemeriksaan suatu obat dalam cairan biologis seperti urin, sebelumnya sudah ada yang melakukannya. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa untuk mengawetkan urin dapat dilakukan tanpa menggunakan pengawet, caranya adalah dengan menyimpannya dalam freezer dengan suhu -18°C . (Chulavatnatol, Charles, 1994 ; Borosova, Mocak, Beinrohr, Miskovic, 2002).

Pada penelitian penetapan kadar ampisilin dalam urin baik yang menggunakan pengawet maupun yang dimasukkan kedalam freezer, tidak memberikan hasil yang baik. Karena yang menjadi masalah adalah adanya urin, dimana komposisi dari urin dapat bereaksi dengan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat yang dapat mengganggu nilai serapan dan juga metode spektrofotometri kurang tepat untuk penelitian ini, karena hasil urai dari ampisilin yang juga ikut bereaksi dengan natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat tidak dapat dipisahkan, sehingga tidak dapat memeriksa secara kuantitatif kadar ampisilin yang utuh atau ampisilin yang tidak berubah menjadi metabolit.

Penelitian sebelumnya telah melakukan pengujian jumlah ampisilin yang terurai menjadi *aminobenzylpenicilloic acid* dalam urin secara *in vitro* akibat proses enzimatik sebesar 12,2% (15 menit), 21,5% (30 menit), 34,3% (1 jam) dan 48,2% (2 jam). (Arita. T., et al, 1979).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Penetapan kadar ampisilin di dalam urin *in vitro* secara spektrofotometri menggunakan pereaksi natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat dapat dilakukan dengan kondisi optimum yaitu pH larutan uji $\pm 9,5$, lamanya reaksi 1 jam dan menggunakan sampel urin sewaktu yang segar. Metode spektrofotometri ini masih ada kelemahannya, dimana pengukuran serapan masih terganggu oleh komponen dari urin.

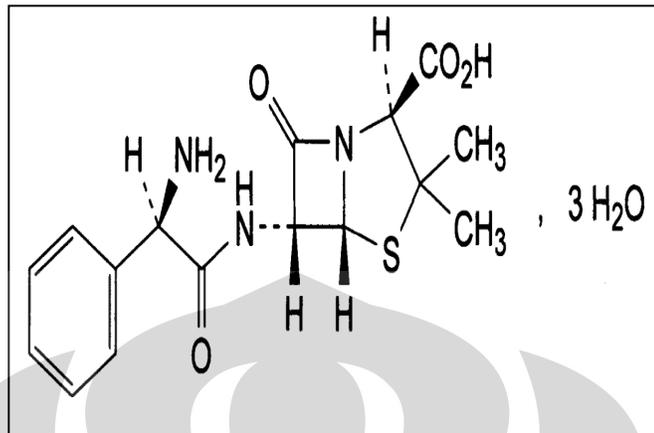
5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya diharapkan dapat menemukan cara untuk memisahkan ampisilin dari urin, cara penyimpanan urin serta cara menangani urin simpan agar tidak mengganggu hasil dari penetapan kadar ampisilin dalam urin.

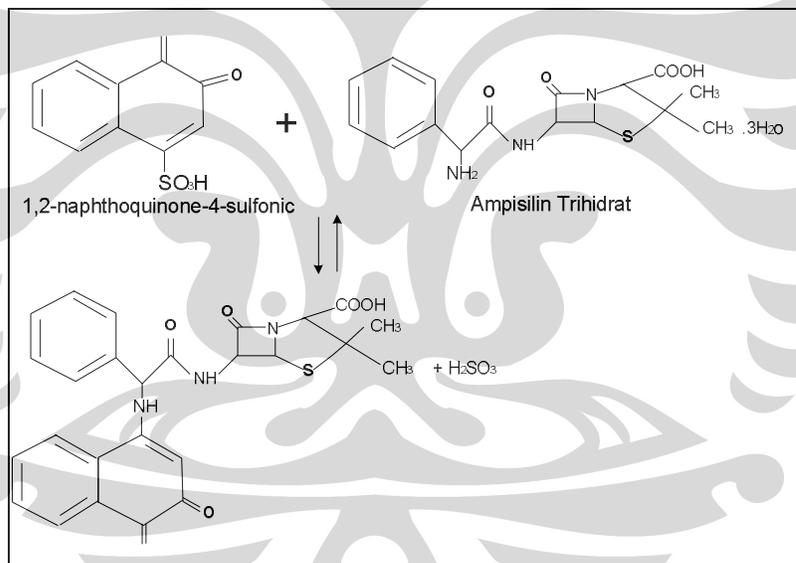
DAFTAR ACUAN

- Arita, T., et al. (1979). *Degradation of ampicillin by urine of patients with complicated urinary tract infection and its protective effect of dicloxacillin*. Jpn J Antibiot (vol.6) 32, 685-692.
- Borosova, D., et al. (2002). *Validation and quality assurance of arsenic determination in urine by GFAAS after toluene extraction*. Polish Journal of Environmental Studies (vol.11) 6, 617-623.
- British pharmacopoeia 2007* (version 11.0) [computer software]. (2006). London : The Stationery Office.
- Chulavatnatol, S., Charles, B.G.(1994). *Determination of dose-dependent absorption of amoxicillin from urinary excretion data in healthy subject*. Br J clin Pharmac 38, 274-277.
- Department of Health and Human Service. (2001). *Guidance for industry bioanalytical method validation* (p. 1-10). Rockville.
- Farmakope indonesia* (edisi 4). (1995). Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Foye, W.O. (1996). *Prinsip-prinsip kimia medicinal* (edisi 2, hal.1532-1533). Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Gunawan, S.G., et al. (2007). *Farmakologi dan terapi* (edisi 5, hal. 585-591 ; 666-669). Jakarta : Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Guyton, Arthur C. (1995). *Buku ajar fisiologi kedokteran* (edisi 9, hal. 324-325) (Irawati, S, Penerjemah). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran.
- Harmita. (2004). *Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian (vol.1) 3, 117-135.

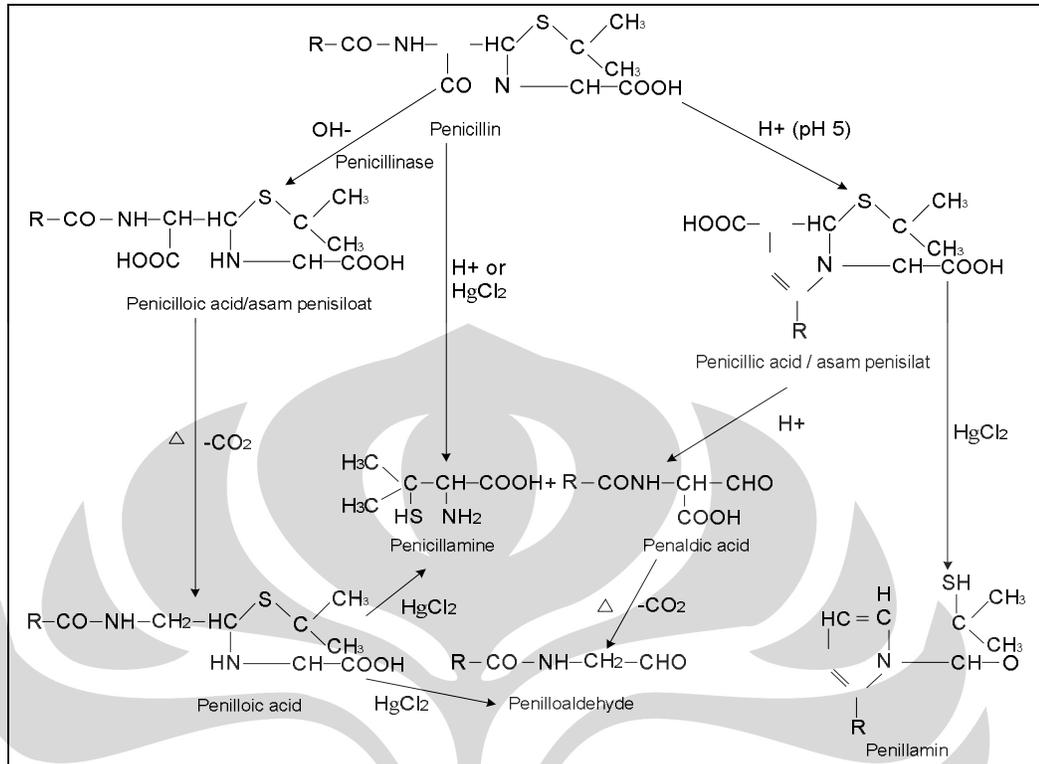
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia* (hal. 20-39 ; 141-161). Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Katzung,B.G. (1989). *Farmakologi dasar dan klinik* (ed.3, hal 618). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kosasih, E.N., Kosasih, A.S. (2008). *Tafsiran hasil pemeriksaan laboratorium klinik* (ed.2, hal.345-353). Tangerang : Karisma Publishing Group.
- Lacy, C. F., et al. (2007). *Drug information handbook with international trade names index* (15th ed., p. 115-116). Lexi Comps.
- Lixiao Xu, Huaiyou Wang, Yan Xiao. (2004). *Spectrophotometric determination of ampicillin sodium in pharmaceutical products using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogenic reagent*. Spectrochim Acta Part A 60, 3007 – 3012.
- Marieb, E.N., Hoehn, K. (2006). *Human anatomy and physiology* (7th ed.) [computer softwear].
- Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W. (2006). *Biokimia harper* (ed.27, hal. 296-302). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sjovall,J., Westerlund, D., Alvan, G. (1985). *Renal excretion of intravenously infused amoxicillin and ampicillin*. Br J clin Pharmac 19, 191-201.
- Sukandar, E.Y., et al. (2008). *ISO Farmakoterapi* (hal. 656-688). Jakarta : Penerbit PT. ISFI.
- Sweetman,S (Ed.). (2007). *Martindale 35* : The complete drug reference [computer software]. Pharmaceutical Press.



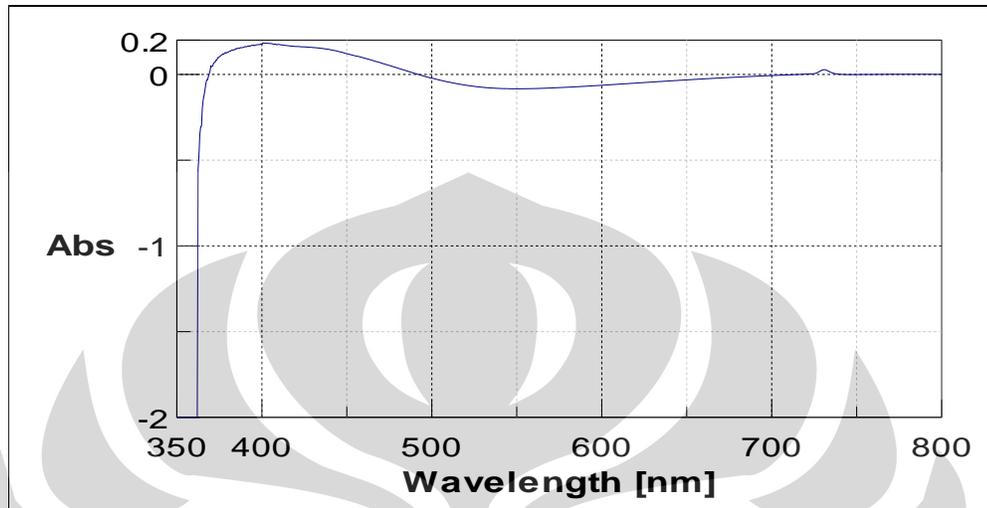
Gambar 2.1 Struktur Ampisilin Trihidrat



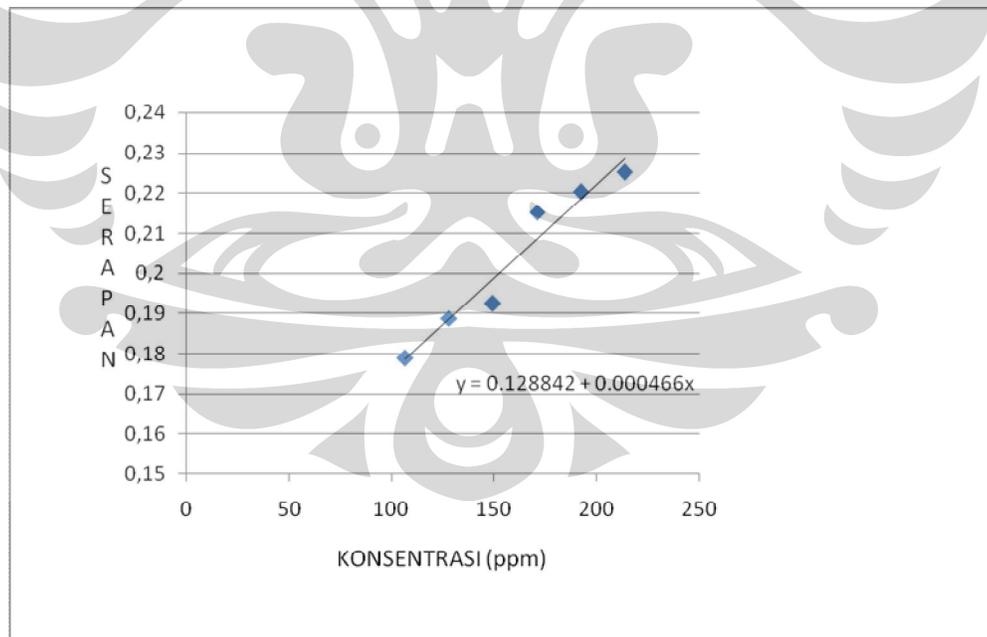
Gambar 2.2 Reaksi antara Ampisilin dengan Sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic



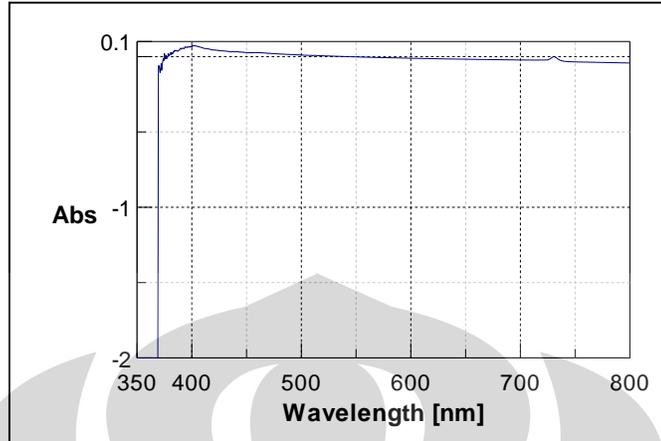
Gambar 2.3 Degradasi Ampisilin



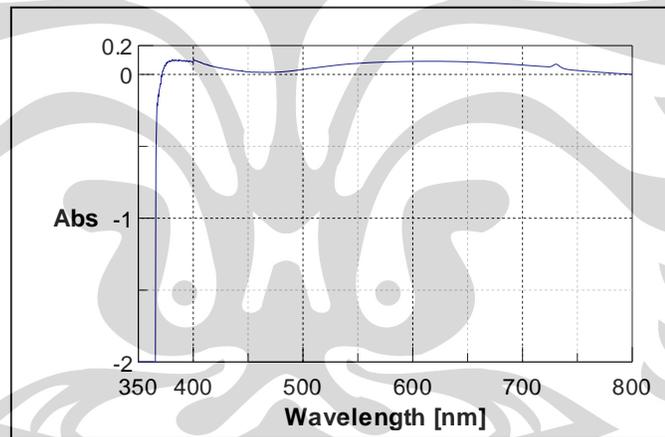
Gambar 4.1 Penentuan panjang gelombang maksimum



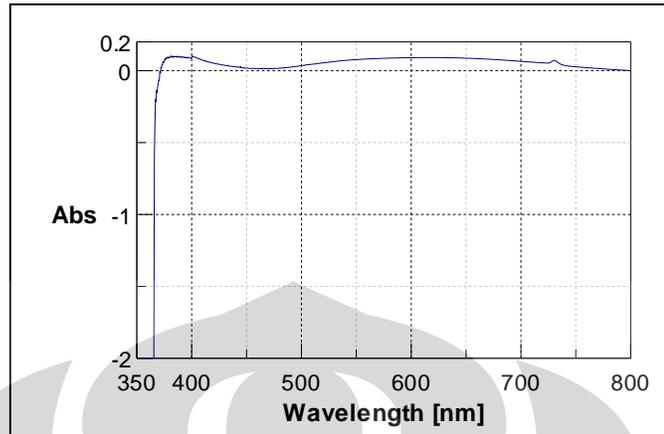
Gambar 4.2 Kurva kalibrasi analisa ampicilin dalam urin



Gambar 4.3 Serapan urin segar tanpa ampisilin



Gambar 4.4 Serapan urin tanpa ampisilin setelah dimasukkan frezer dengan blanko urin segar



Gambar 4.5 Serapan urin segar dengan ampisilin pada konsentrasi 106,8 ppm

Tabel 4.1 Penentuan lamanya pendiaman larutan uji pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin

Konsentrasi (ppm)	Waktu pendiaman (menit)	Panjang gelombang (nm)	A
82,46	15	401	0,11272
	30	401	0,12960
	45	401	0,13348
	60	401	0,13624
	75	401	0,13290
	90	401	0,13221
	105	401	0,12978
	120	401	0,12765
	135	401	0,11590
	150	401	0,06345
	165	401	0,01754
	180	401	-0,00501

Tabel 4.2 Data kurva kalibrasi penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	A
106,80	0,17888
128,16	0,18885
149,52	0,19253
170,88	0,21524
192,24	0,22028
213,60	0,22519

Dari kurva kalibrasi, maka didapat persamaan garisnya yaitu :

$$y = 0,128842 + 0,000466x \text{ dan nilai } r = 0,973669$$

Tabel 4.3 Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin

X (ppm)	Y (A)	Yi	Y-Yi	(Y-Yi) ²
106,80	0,178880	0,178610	0,000270	0,0000000729
128,16	0,188850	0,188560	0,000290	0,0000000841
149,52	0,192530	0,198520	0,005990	0,0000358801
170,88	0,215240	0,208470	0,006770	0,0000458329
192,24	0,220280	0,218430	0,001850	0,0000034225
213,60	0,225190	0,228380	0,003190	0,0000101761
Jumlah				0,0000954686

Dari hasil perhitungan di dapat nilai LOD dan LOQ berturut-turut yaitu 31,4524 ppm dan 104,8412 ppm.

Tabel 4.4 Hasil perhitungan akurasi pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	A	Konsentrasi hasil analisis (ppm)	UPK (%)	Rata- rata (%)	KV (%)
106,80	0,17888	107,38	100,54	102,46	5,02
	0,18385	118,04	110,53		
	0,17817	105,85	99,11		
	0,17750	104,42	97,77		
	0,18078	111,45	104,36		
128,16	0,18885	128,77	100,48	100,62	3,93
	0,19253	136,67	106,64		
	0,18952	130,21	101,60		
	0,18630	123,30	96,21		
	0,18748	125,83	98,18		
149,52	0,19032	131,93	88,23	95,11	4,62
	0,19596	144,03	94,92		
	0,19532	142,66	95,41		
	0,19498	141,93	96,63		
	0,19876	150,04	100,35		
170,88	0,21587	186,76	109,29	107,06	2,28
	0,21360	181,88	106,44		
	0,21524	185,40	108,50		
	0,21480	184,46	107,95		
	0,21096	176,22	103,12		
192,24	0,22028	196,22	102,07	102,21	0,94
	0,22107	197,91	102,95		
	0,22048	196,65	102,29		
	0,22181	199,50	103,38		
	0,21908	193,64	100,73		

Tabel 4.5 Hasil perhitungan presisi pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	A	Arata-rata	SD	KV (%)
106,80	0,17888 0,18385 0,17817 0,17750 0,18078	0,179836	0,00256	1,42
128,16	0,18885 0,19253 0,18952 0,18630 0,18748	0,188936	0,00236	1,25
149,52	0,19032 0,19596 0,19532 0,19498 0,19876	0,195068	0,00304	1,56
170,88	0,21587 0,21360 0,21524 0,21480 0,21096	0,21413	0,00194	0,91
192,24	0,22028 0,22107 0,22048 0,22181 0,21908	0,220544	0,00101	0,46

Tabel 4.6 Hasil perhitungan uji stabilitas dengan metode beku-cair pada penetapan kadar ampisilin di dalam urin dengan berbagai konsentrasi

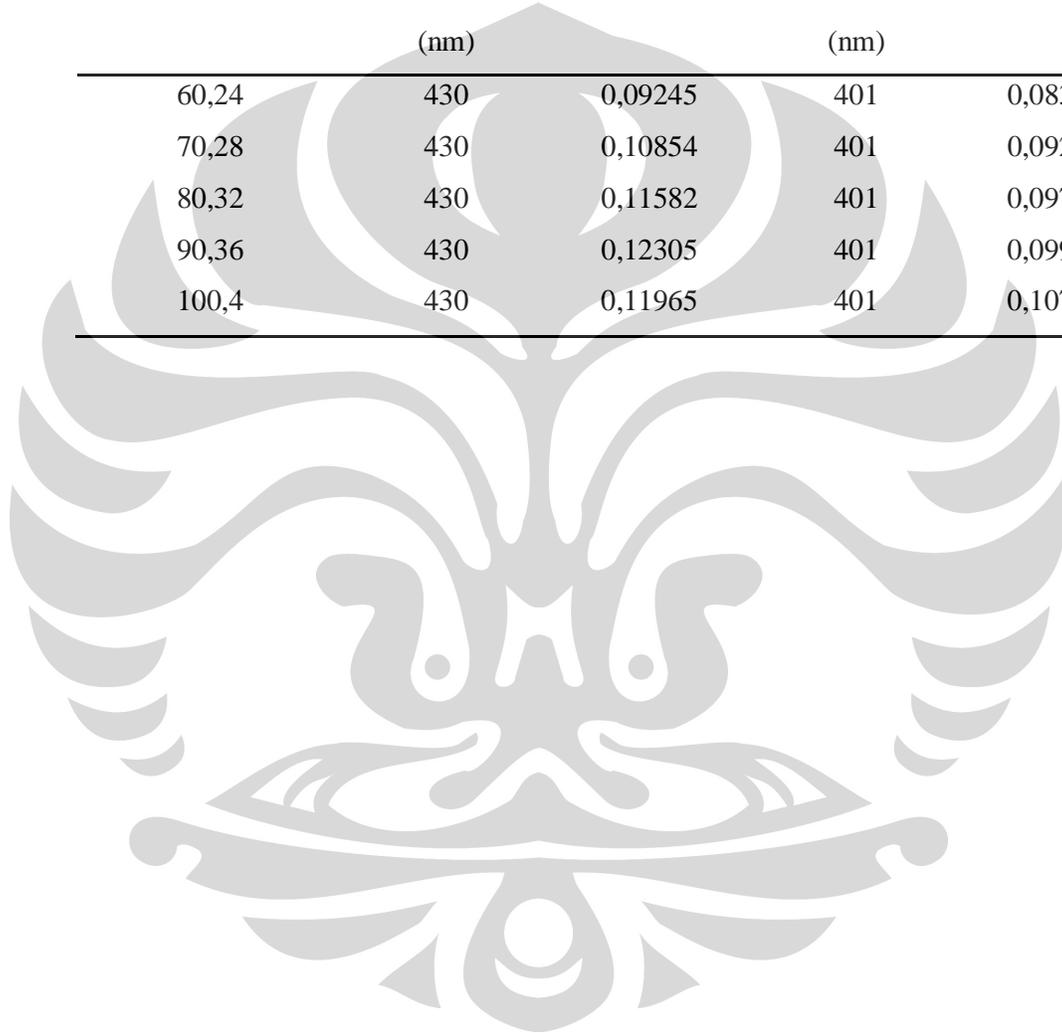
Konsentrasi (ppm)	Siklus	A	ΔA	% diff
42,75	0	0,07184		
	1	0,09316	0,02132	29,67 %
	2	0,11200	0,04016	55,90 %
	3	0,14418	0,07234	100,70 %
106,88	0	0,10348		
	1	0,11009	0,00661	6,39 %
	2	0,12683	0,02335	22,56 %
	3	0,17664	0,07316	70,70 %
160,32	0	0,11887		
	1	0,13624	0,01737	14,61 %
	2	0,14123	0,02236	18,81 %
	3	0,19516	0,07629	64,18 %

Tabel 4.7 Pengaruh kesegaran urin terhadap serapan (dibuat larutan standar baru sesuai waktu pendiaman urin)

Konsentrasi	Waktu (jam)	A
136 ppm	0.25	0.12795
		0.1278
		0.12805
	0.5	0.1498
		0.14996
		0.1502
1.0	0.01839	
	0.00987	
	0.01246	

Tabel 4.8 Perbandingan panjang gelombang dan serapan larutan uji yang diberi toluen dengan larutan uji tanpa toluene

Konsentrasi (ppm)	Toluen		Tanpa Toluen	
	Panjang gelombang maksimum (nm)	A	Panjang gelombang maksimum (nm)	A
60,24	430	0,09245	401	0,08354
70,28	430	0,10854	401	0,09208
80,32	430	0,11582	401	0,09756
90,36	430	0,12305	401	0,09987
100,4	430	0,11965	401	0,10758



Lampiran 1 Cara menghitung batas deteksi dan batas kuantitasi

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum(Y-Y_i)^2}{n-2}}$$

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{0.0000954686}{6-2}} = 0,0048856$$

Batas Deteksi :

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S(y/x)}{b}$$

$$\text{LOD} = \frac{3(0,0048856)}{0,000466}$$

$$\text{LOD} = 31,4524 \text{ ppm}$$

Batas Kuantitas :

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S(y/x)}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10(0,0048856)}{0,000466}$$

$$\text{LOQ} = 104,8412 \text{ ppm}$$

Lampiran 2 Cara menghitung simpangan baku dan koefisien variasi

$$\text{Rata-rata : } \bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan baku atau standard deviasi :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Koefisien Variasi

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Contoh :

Hasil uji presisi standard Ampisilin trihidrat 106,8 ppm

Serapan rata-rata : 0,00256

$$SD = \sqrt{\frac{(0,17750 - 0,179836)^2 + (0,17888 - 0,179836)^2 + (0,18385 - 0,179836)^2 + (0,17817 - 0,179836)^2 + (0,18078 - 0,179836)^2}{5-1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{2,614972 \cdot 10^{-5}}{4}}$$

$$SD = 2,56 \cdot 10^{-3}$$

$$KV = \frac{2,56 \cdot 10^{-3}}{0,179836} \cdot 100\% = 1,42 \%$$

Lampiran 3 Contoh spektrofotometer Jasco V-530