



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DAN ANALISIS RADIOFARMAKA
 ^{99m}Tc -SIPROFLOKSASIN UNTUK DIAPLIKASIKAN TERHADAP
BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus* YANG
RESISTEN TERHADAP KOTRIMOKSAZOL**

SKRIPSI

**KIKI RIZKI LESTARI
0606070794**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DAN ANALISIS RADIOFARMAKA
 ^{99m}Tc -SIPROFLOKSASIN UNTUK DIAPLIKASIKAN TERHADAP
BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus* YANG
RESISTEN TERHADAP KOTRIMOKSAZOL**

SKRIPSI

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

**KIKI RIZKI LESTARI
0606070794**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Kiki Rizki Lestari

NPM : 0606070794

Tanda Tangan :



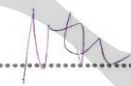

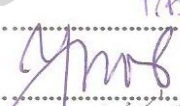


Tanggal : 1 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Kiki Rizki Lestari
NPM : 0606070794
Program Studi : S1 Farmasi Reguler
Judul Skripsi : Sintesis dan Analisis Radiofarmaka ^{99m}Tc -
Siprofloksasin untuk Diaplikasikan terhadap
Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang Resisten terhadap Kotrimoksazol

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 : Dr. Nelly D. Leswara, Msc. Apt, ()
Pembimbing II : Iim Halimah, S. Si ()
Penguji I : Dr. Yahdiana Harahap, MS ()
Penguji II : Dra. Juheini, M.Si ()
Penguji III : Prof. Dr. Atiek S., MS ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 5 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim.

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini tepat waktu.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga penulis dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Ibu Dr. Nelly Dhevita Leswara Apt., M. Sc, selaku pembimbing I yang telah membimbing, memberikan saran, kritik, dan ilmu yang membangun selama penulis melakukan penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Iim Halimah S.Si selaku pembimbing II, yang telah membimbing, memberikan masukan, motivasi serta ilmu yang membangun selama penelitian dan penyusunan skripsi di PTNBR BATAN Bandung.
4. Bapak Dr. Hasan Rachmat M dan Ibu Dr. Katrin, MS, selaku pembimbing akademis yang membimbing penulis selama menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Ibu Dr. Muhayatun, MT selaku Ketua Bidang SBR (Senyawa Bertanda Radiometri) serta Ibu Isti, Ibu Maula, Bapak Teguh, Bapak Epy yang telah membantu penulis dalam melakukan penelitian di Laboratorium Sintesis Senyawa Bertanda PTNBR BATAN Bandung.
6. Ibu Iim Halimah S.Si, selaku Ketua Kelompok Biodinamika dan Biosintesis serta Ibu Yetti, Ibu Prina, Ibu Wita, Bapak Yana yang telah

membantu penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Biologi PTNBR BATAN Bandung.

7. Seluruh staf PTNBR BATAN Bandung yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian di PTNBR BATAN Bandung.
8. PT. Kalbe Farma yang telah membantu penulis dalam pengadaan antibiotik kotrimoksazol (Sulfametoksazol dan Trimetoprim).
9. Keluargaku tercinta, Mama, Papa, dan Putri, yang memberikan doa, nasehat, motivasi, dan dukungan kepada penulis selama melakukan penelitian dan penulisan skripsi.
10. RM dan sahabat-sahabat terbaikku, Ema, Tha, dan Anggie yang selalu memberikan semangat, dan keceriaan dalam hari-hari penulis.
11. Maria, teman seperjuangan di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Sintesis Senyawa Bertanda di PTNBR BATAN Bandung serta Yanuar, Danu, Lingga yang setia menemani penulis selama di Bandung.
12. Teman-teman terbaikku, Sandy, Rangga, Eja, Aulia, Maulana, Hendra, Dede, Dudu, Kak Achil, Delly, Bahriyun, serta seluruh keluarga besar Farmasi Universitas Indonesia angkatan 2006, *Rainbow United*, atas keceriaan, kekompakan, dan kebersamaan selama penulis menimba ilmu di Farmasi UI Depok.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikannya skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari pembaca. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan Farmasi pada khususnya.

Penulis

2010

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Kiki Rizki Lestari
NPM : 0606070794
Program Studi : S1 Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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 :

Sintesis dan Analisis Radiofarmaka ^{99m}Tc -Siprofloksasin untuk Diaplikasikan terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang Resisten terhadap Kotrimoksazol

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



(Kiki Rizki Lestari)

vii

ABSTRAK

Nama Mahasiswa : Kiki Rizki Lestari
Program Studi : Farmasi
Judul Tugas Akhir : Sintesis dan Analisis Radiofarmaka ^{99m}Tc -Siprofloksasin untuk Diaplikasikan Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang Resisten Terhadap Kotrimoksazol

Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin merupakan salah satu radiofarmaka yang dikembangkan oleh BATAN untuk mendiagnosis infeksi dan mengetahui efektivitas terapi infeksi dengan suatu antibiotik. Resistensi bakteri terhadap suatu antibiotik menjadi suatu masalah bagi penggunaan radiofarmaka ini. Tujuan penelitian ini adalah untuk mensintesis, menganalisis radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin, dan menentukan *uptake* bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang telah dibuat resisten terhadap kotrimoksazol. Bakteri dibuat resisten dengan memberikan antibiotik kotrimoksazol dibawah kadar hambat minimumnya selama berturut-turut lima hari untuk *Escherichia coli* dan empat hari untuk *Staphylococcus aureus* yang selanjutnya ditentukan *uptake* terhadap ^{99m}Tc -siprofloksasin. Radiofarmaka siprofloksasin dibuat dalam bentuk kit-kering secara aseptis dengan proses liofilisasi. Preparasi radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dilakukan dengan penambahan radionuklida ^{99m}Tc , aktivitas 2-13 mCi ke dalam kit-kering siprofloksasin sesaat sebelum digunakan. Kontrol kualitas radiofarmaka dilakukan dengan menentukan pH, sterilitas, dan kemurnian radiokimia dengan metode kromatografi. Fase diam ITLC-SG dengan fase gerak larutan etanol, aquabidest, ammonia (2: 5: 1) memisahkan pengotor $^{99m}\text{TcO}_4^-$ sedangkan fase diam Whatman 1 dengan fase gerak Etil Metil Keton memisahkan pengotor $^{99m}\text{TcO}_2$. Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin yang didapat sebesar $87,45 \pm 3,88\%$ (n= 3). Bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten kotrimoksazol memberikan *uptake* sebesar $41,94 \pm 7,17\%$ (n= 6) dan bakteri *Escherichia coli* yang resisten kotrimoksazol memberikan *uptake* sebesar $37,12 \pm 6,54\%$ (n= 6).

Kata kunci: *Escherichia coli*, radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin, resisten, *Staphylococcus aureus*, *uptake*
xiv + 66 halaman: 23 gambar; 11 tabel; 5 lampiran
Daftar acuan : 42 (1962-2009)

ABSTRACT

Name : Kiki Rizki Lestari
Program Study : Pharmacy
Title : Synthesis and Analysis of ^{99m}Tc -Ciprofloxacin Radiopharmaceutical to be Applied to Cotrimoxazole-Resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

The ^{99m}Tc -ciprofloxacin is one of radiopharmaceuticals being developed by BATAN for infection diagnosis and identification of infection therapy effectiveness using antibiotic. Resistance bacteria to antibiotics become a problem for the usage of radiopharmaceutical. The aims of this study are to synthesize and analyze ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical and find out the uptake of cotrimoxazole-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. These resistant bacteria were obtained by giving cotrimoxazole below their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) during four days for *Staphylococcus aureus wild-type* and five days for *Escherichia coli wild-type* and determined their uptake to ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical. The ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical was made as a dried-kit aseptically using lyophilization technique. The preparation of ^{99m}Tc -ciprofloxacin was done by adding 2-13 mCi of ^{99m}Tc radionuclide into ciprofloxacin dried-kit right before being used. Quality control of ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical was performed by determining radiochemical of ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical using chromatography method. The ITLC-SG as a stationary phase with a mixture of ethanol, aquabidest, ammonia (2: 5: 1) as mobile phase will separate $^{99m}\text{TcO}_4^-$ impurity, and Whatman 1 as a stationary phase with Ethyl Methyl Keton as mobile phase will separate $^{99m}\text{TcO}_2$ impurity. The purity of radiochemical was $87,45 \pm 3,88\%$ (n= 3). The uptake of ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical by Cotrimoxazole-resistant *Staphylococcus aureus* was $41,94 \pm 7,17\%$ (n= 6) and the uptake of ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical by Cotrimoxazole-resistant *Escherichia coli* was $37,12 \pm 6,54\%$ (n= 6).

Keywords : *Escherichia coli*, resistant, *Staphylococcus aureus*, uptake, ^{99m}Tc -ciprofloxacin Radiopharmaceutical

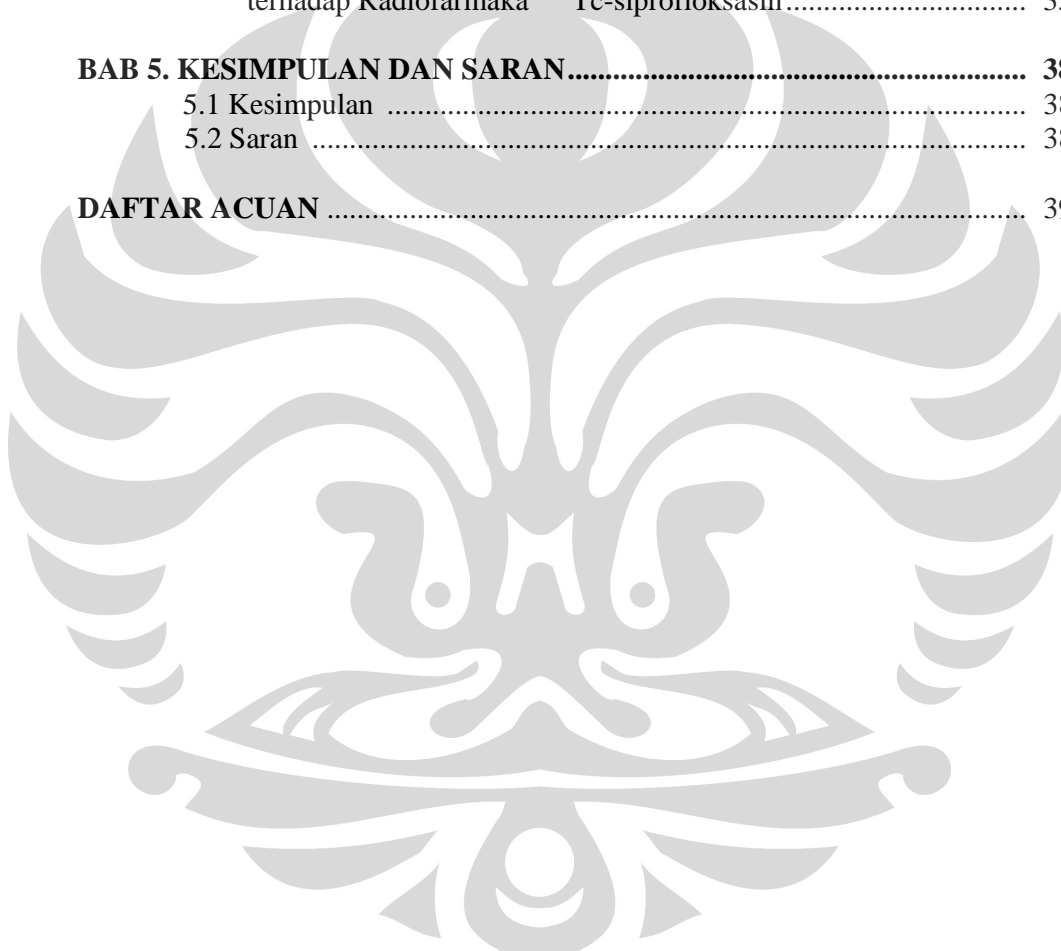
xiv + 66 pages : 23 figures; 11 tables; 5 appendices

Bibliography : 42 (1962-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Radiofarmaka.....	3
2.1.1 Generator.....	3
2.1.2 Liofilisasi	5
2.1.3 Detektor Radiasi.....	6
2.1.4 Radionuklida Teknesium-99m (^{99m} Tc)	8
2.1.5 Kontrol Kualitas Radiofarmaka	9
2.1.5.1 Uji Kemurnian Radiokimia	9
2.1.5.2 Uji Sterilitas Kit Radiofarmaka	10
2.1.6 Radiofarmaka ^{99m} Tc-Siprofloksasin.....	11
2.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	12
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3 Antibiotik Kotrimoksazol	13
2.4 Uji Antimikroba.....	15
2.5 Resistensi.	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	19
3.2 Bahan	19
3.3 Alat.....	20
3.4 Cara Kerja.....	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Sintesis Kit-Kering Siprofloksasin	29
4.2 Penentuan Sterilitas Kit-Kering Siprofloksasin.....	29

4.3	Identifikasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	30
4.4	Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) Antibiotik Kotrimoksazol terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus wild-type</i>	30
4.5	Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) Antibiotik Kotrimoksazol terhadap Bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i>	31
4.6	Penentuan Resistensi Bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i> terhadap Antibiotik Kotrimoksazol.....	31
4.7	Penandaan Kit-Kering Siprofloksasin dengan Radionuklida ^{99m}Tc	32
4.8	Pengujian Kemurnian Radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin.....	33
4.9	Penentuan <i>Uptake</i> Bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i> dan <i>Staphylococcus aureus wild-type</i> yang Resisten Kotrimoksazol terhadap Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.....	35
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN		38
5.1	Kesimpulan	38
5.2	Saran	38
DAFTAR ACUAN		39



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Bagan generator $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	4
2.2 Reaksi pembentukan radioaktif ^{99}Mo dari ^{98}Mo	4
2.3 Skema peluruhan radionuklida ^{99}Mo	8
2.4 Struktur kimia siprofloksasin.....	11
2.5 Struktur kimia kompleks $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin.....	12
2.6 Mekanisme kerja beberapa antibiotik terhadap bakteri.....	14
2.7 Struktur kimia sulfametoksazol.....	15
2.8 Struktur kimia trimetoprim.....	15
3.1 Generator $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ buatan BATAN TEKNOLOGI.....	43
3.2 Pencacah Saluran Tunggal (<i>Single Channel Analyzer</i>) dengan detektor NaI(Tl) (Ortec).....	43
3.3 Alat <i>Dose Calibrator</i> (Victoreen).....	44
3.4 Kontainer timbal.....	44
3.5 Kertas Whatman 1 (Kiri) dan ITLC-SG (kanan) untuk proses pencacahan.....	45
3.6 Aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (<i>Single Channel Analyzer</i>).....	45
3.7 Pencacahan <i>Background</i> (latar belakang) dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (<i>Single Channel Analyzer</i>).....	46
3.8 Pencacahan sampel dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (<i>Single Channel Analyzer</i>).....	46
3.9 Penyelesaian dan penyimpanan hasil pencacahan dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (<i>Single Channel Analyzer</i>).....	47
3.10 Tampilan hasil pencacahan dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (<i>Single Channel Analyzer</i>).....	48
4.1 Hasil kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap <i>Staphylococcus aureus wild-type</i>	49
4.2 Hasil kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap <i>Escherichia coli wild-type</i>	49
4.3 Hasil pengujian kepekaan bakteri <i>Staphylococcus aureus wild-type</i> terhadap antibiotik kotrimoksazol konsentrasi 37,50 ppm.....	50
4.4 Hasil pengujian kepekaan bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i> terhadap antibiotik kotrimoksazol konsentrasi 37,50 ppm.....	51
4.5 Diagram batang hasil uji kemurnian radiofarmaka $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hasil pengamatan uji kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus wild-type</i>	53
4.2 Hasil pengamatan uji kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i>	54
4.3 Diameter zona inhibisi bakteri <i>Staphylococcus aureus wild-type</i> yang diberikan antibiotik kotrimoksazol selama empat hari berturut-turut.....	55
4.4 Diameter zona inhibisi bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i> yang diberikan antibiotik kotrimoksazol selama lima hari berturut-turut	55
4.5 Data cacahan uji kemurnian radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dengan fase diam ITLC-SG dan fase gerak larutan etanol: H ₂ O: ammonia (2:5:1).....	56
4.6 Data cacahan uji kemurnian radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dengan fase diam Whatman 1 dan fase gerak Etil Metil Keton	57
4.7 Hasil uji kemurnian radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.....	57
4.8 Data cacahan <i>uptake</i> bakteri <i>Staphylococcus aureus wild-type</i> resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.....	58
4.9 Persentase hasil <i>uptake</i> bakteri <i>Staphylococcus aureus wild-type</i> resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.....	59
4.10 Data cacahan <i>uptake</i> bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i> resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.....	60
4.11 Persentase hasil <i>uptake</i> bakteri <i>Escherichia coli wild-type</i> resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.....	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Komposisi medium	62
2 Rumus perhitungan kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin	63
3 Rumus perhitungan <i>uptake</i> bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin	64
4 Sertifikat analisis sulfametoksazol dari PT. Kalbe Farma	65
5 Sertifikat analisis trimetoprim dari PT. Kalbe Farma	66



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan dalam bidang kedokteran nuklir menghasilkan suatu teknik diagnosis menggunakan radiofarmaka sebagai metode alternatif untuk mendeteksi lokasi dari penyakit infeksi. Bidang kedokteran nuklir salah satu rumah sakit di Bandung telah mengaplikasikan metode diagnosis infeksi menggunakan antibiotik bertanda radioaktif, yaitu ^{99m}Tc -siprofloksasin. Diagnosis infeksi dengan antibiotik bertanda radioaktif dapat dimanfaatkan untuk mengetahui adanya infeksi atau untuk mengetahui efektivitas suatu terapi infeksi dengan antibiotik.

Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin mulai dikembangkan pada tahun 1998, di Rumah Sakit Bartholomews, London, Inggris yang dikenal dengan nama *Infecton* (Hall et al., 1998). Radiofarmaka ini selanjutnya diaplikasikan ke dalam tubuh manusia, sehingga perlu dilakukan pengujian beberapa sifat fisikokimianya seperti pH, sterilitas, dan aktivitas radiofarmaka, serta kemurnian radiokimia agar sesuai dengan keperluan diagnosis yang diinginkan. Radionuklida yang ideal untuk tujuan diagnosis adalah Teknesium-99m (^{99m}Tc) karena sifat-sifatnya yang menguntungkan antara lain mempunyai waktu paruh yang relatif pendek (6,02 jam), memancarkan sinar γ dengan energi sebesar 140 keV dan toksisitasnya rendah (Mahmood dan Jones, 2003).

Dalam perkembangannya, diagnosis infeksi dilakukan dengan metode pencitraan menggunakan antibiotik bertanda radioaktif. Sifat bakterisid suatu antibiotik akan menyebabkan terjadinya akumulasi antibiotik yang bertanda radioaktif pada daerah infeksi yang disebabkan oleh bakteri (Britton et al., 1997). Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon yang aktif terhadap bakteri gram negatif dan gram positif (Mariana dan Setiabudy, 1995), sehingga antibiotik siprofloksasin yang bertanda radionuklida ^{99m}Tc ini dapat mendeteksi lokasi infeksi yang disebabkan oleh bakteri penyebab infeksi baik gram negatif seperti *Escherichia coli* maupun gram positif seperti *Staphylococcus aureus* (Sonmezoglu et al., 2001). Antibiotik yang biasa digunakan sebagai terapi infeksi dari bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* tersebut antara lain

adalah kotrimoksazol yang merupakan kombinasi 5 : 1 dari sulfametoksazol dan trimetoprim (Mariana dan Setiabudy, 1995).

Masalah resistensi mikroorganisme yang mulai muncul pada tahun 1980-an (Pratiwi, 2008; Bisht, et al., 2009) menyebabkan perlunya dilakukan suatu penelitian pendahuluan untuk melihat apakah bakteri-bakteri penyebab infeksi baik gram negatif maupun positif seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang telah resisten terhadap antibiotik kotrimoksazol yang umum digunakan sebagai terapi masih dapat memperlihatkan *uptake* (daya ikat) terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin agar dapat dihasilkan diagnosis infeksi yang tepat.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Mensintesis dan menganalisis radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin
2. Menentukan *uptake* (daya ikat) radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang telah resisten terhadap antibiotik kotrimoksazol

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radiofarmaka

Radiofarmaka didefinisikan sebagai suatu senyawa radioaktif dengan maksud untuk dimasukkan ke dalam tubuh manusia, baik untuk tujuan terapi maupun diagnosis serta mengalami perubahan metabolisme di dalam tubuh (Tubis dan Wolf, 1976). Dalam kedokteran nuklir, hampir 95% dari radiofarmaka digunakan untuk tujuan diagnosis dan sisanya digunakan sebagai terapi (Saha, 2003). Beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh suatu radionuklida yang digunakan sebagai radiofarmaka untuk tujuan diagnosis, antara lain (*Coaching Radioisotop*, 2009):

- a. Waktu paruh ($T_{1/2}$) diupayakan sependek mungkin dengan aktivitas jenis yang setinggi mungkin, tapi waktu tersebut masih cukup untuk melakukan diagnosis.
- b. Dapat digabungkan dengan senyawa yang secara selektif diserap oleh organ yang akan diperiksa.
- c. Memenuhi syarat farmasetikal, yaitu bebas kontaminasi kimia dan biologik serta tidak toksik.
- d. Diutamakan pemancar gamma, dengan energi yang mampu menembus atau berpenetrasi ke dalam jaringan atau tubuh, tetapi dapat memudahkan deteksi dengan peralatan dari luar, umumnya menggunakan kamera gamma. Memiliki energi antara 100-510 keV, idealnya yaitu antara 100-140 keV.

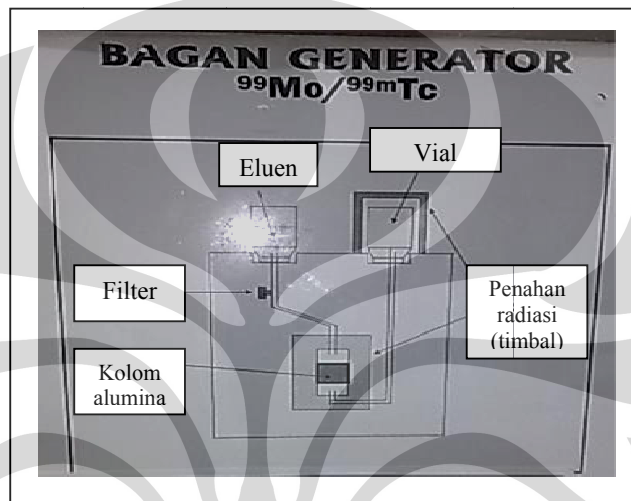
Dari persyaratan diatas, radionuklida Teknesium-99m (^{99m}Tc) merupakan radionuklida yang ideal untuk tujuan diagnosis dengan waktu paruh pendek (6,02 jam), pemancar gamma dan memiliki energi sebesar 140 keV (Mahmood dan Jones, 2003).

2.1.1 Generator

Generator menghasilkan sumber radionuklida dengan waktu paruh pendek, yang baik untuk aplikasi medis. Masa berlaku suatu generator bergantung pada

waktu paruh dari radionuklida induk. Semakin panjang waktu paruh radionuklida induk, semakin lama pula radionuklida anak dapat dielusi dalam jumlah yang memadai (Eckelman dan Coursey, 1982).

Generator terdiri atas kolom gelas berisi adsorben seperti aluminium oksida (Al_2O_3) atau resin penukar ion yang mengikat radionuklida induk dan dilengkapi dengan filter untuk menahan partikel-partikel asing seperti yang terlihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Bagan generator $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Generator ini mengandung ion Molibdat radioaktif, $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ terserap dalam butiran alumina. Ion $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ dihasilkan pada reaktor nuklir, dimana isotop $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ non radioaktif dibombardir dengan elektron.



[sumber: *Coaching* Radioisotop, 2009]

Gambar 2.2 Reaksi pembentukan radioaktif ^{99}Mo dari ^{98}Mo

Molibdenum radioaktif ini diserap pada alumina, ditempatkan dalam generator. Ion $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ diperoleh ketika inti $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ meluruh. Jika dibutuhkan, ion $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ dalam generator dielusi dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% (*Coaching* Radioisotop, 2009).

2.1.2 Liofilisasi

Liofilisasi adalah proses pengeringan dari bahan beku dengan cara sublimasi, yaitu perubahan langsung dari kondisi beku ke bentuk uap air tanpa melalui fase cair terlebih dahulu (Neuman dan Koln, 1962). Teknik liofilisasi merupakan metode yang paling sering digunakan dalam preparasi kit radiofarmaka untuk memelihara bahan kimia atau biologi yang sensitif dari kelembaban, seperti enzim, hormon, vitamin, antibiotik, dan kit radiofarmaka.

Proses liofilisasi memiliki beberapa keuntungan, yaitu sediaan dapat dikeringkan tanpa merusak struktur atom atau molekul zat tersebut, sediaan yang dikeringkan akan mudah dilarutkan kembali, penampilan sediaan lebih baik daripada dalam keadaan cair, hasil sediaan umumnya lebih stabil dan bertahan lama, serta lebih mudah dalam hal penyimpanan dan transportasi sediaan kering daripada yang cair. Proses liofilisasi melewati 3 tahap (*Coaching Radioisotop*, 2009):

1. Tahap pembekuan

Seluruh sediaan di dalam vial harus sudah benar-benar membeku. Hal ini harus diperhatikan karena umumnya sediaan mengandung bahan organik dan anorganik yang akan membeku secara terpisah.

2. Sistem vakum

Tekanan diusahakan mencapai 5-50 μmHg . Tujuannya adalah untuk menghilangkan seluruh udara yang tidak dapat terkondensasi, karena hal ini akan membantu untuk mengurangi tertahannya aliran uap air pada waktu sublimasi dan mencegah terjadinya oksidasi selama pengeringan. Dalam tahap ini terjadi sublimasi dari air yang berada dalam sediaan langsung dari bentuk es ke bentuk uap air, yang langsung terhisap keluar oleh pompa vakum. Tahap ini memerlukan waktu paling lama, tergantung dari sifat sediaan yang dikeringkan.

3. Tahap pemanasan

Tahap ini ditujukan untuk mendesak air keluar dari dalam sediaan. Kenaikan suhu harus dipantau dengan seksama agar kenaikan suhu tidak akan merusak komponen dari kit. Suhu pemanasan dinaikkan berangsur-angsur untuk mencegah

Universitas Indonesia

terjadinya pencairan kembali dari sediaan. Suhu pemanasan berkisar antara 5° C sampai 65° C. Dengan memperhatikan sifat fisik dan kimia sediaan yang dikeringkan, pemilihan suhu pemanasan harus sangat hati-hati. Selanjutnya sediaan yang telah kering akan tertutup secara otomatis dalam keadaan masih vakum, atau untuk sediaan yang sangat peka terhadap oksidasi dapat pula sebelum penutupan vial dialiri dengan gas nitrogen. Beberapa kondisi yang dibutuhkan dalam liofilisasi:

- a. Produk harus dalam kondisi beku, umumnya dibawah titik eutektik (-10°C hingga -50° C).
- b. Permukaan kondensasi harus dipersiapkan (-40° C hingga -50° C) untuk menjebak uap es.
- c. Sistem evakuasi yang besar harus dipersiapkan, yang mampu mengevakuasi ke tekanan absolut antara 5 dan 25 mmHg.
- d. Sumber pemanasan yang dapat diatur suhunya, penting untuk memasukkan panas ke dalam produk.

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam pengeringan dengan proses liofilisasi, yaitu:

- a. Suhu dari material harus diatur dengan baik agar terhindar dari proses mencair namun tekanan uap ke atas tidak hilang akibat terlalu dingin.
- b. Molekul uap air yang keluar dari bahan yang beku seharusnya dihilangkan agar terhindar dari kejenuhan tekanan uap di atas bahan yang ingin dikeringkan.
- c. Proses seharusnya dilakukan dalam kondisi vakum sehingga penghilangan molekul air tidak terganggu akibat adanya residu yang berupa gas.

2.1.3 Detektor Radiasi

Detektor radiasi nuklir yang digunakan untuk pengukuran diklasifikasikan menurut prinsip kerjanya seperti sifat interaksi antara radiasi dengan media dalam detektor. Secara umum detektor nuklir terbagi dalam 3 jenis, yaitu detektor isian gas, detektor semikonduktor, dan detektor sintilasi (*Coaching Radioisotop*, 2009).

Pada penelitian ini, detektor yang digunakan adalah detektor sintilasi. Ada bermacam-macam bahan yang dapat memancarkan kerlipan cahaya atau

sintilasi (*scintillation*) apabila berinteraksi dengan sinar gamma, partikel alfa, dan partikel beta yang disebut sebagai sintilator, bisa dalam bentuk padat atau cair. Berdasarkan proses sintilasi tersebut benda demikian dapat digunakan sebagai detektor sinar radioaktif dan disebut sebagai detektor sintilasi.

Bila semua atau sebagian energi radiasi sinar beta atau gamma dilepaskan dalam sintilator, maka foton dengan intensitas sebanding dengan jumlah energi yang dilepaskan. Pulsa-pulsa ini dideteksi oleh *Photo Multiplier Tube* dan diubah menjadi pulsa listrik, kemudian dianalisis dengan penganalisa tinggi pulsa menghasilkan spektrum tinggi pulsa yang berkaitan dengan spektrum energi radiasi yang dipancarkan oleh sumber (Farmakope Indonesia, 1995).

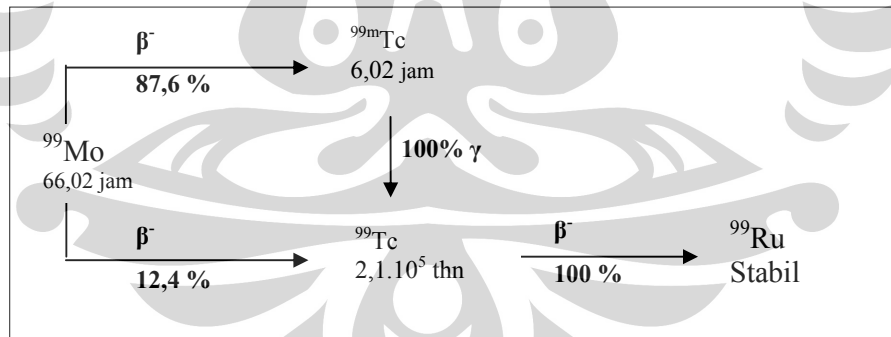
Dalam spektroskopi gamma, sering digunakan detektor NaI (Tl), detektor ini terbuat dari kristal tunggal NaI dengan pengotoran sedikit Thallium, sehingga detektor ini dikenal sebagai detektor NaI (Tl). Kristal ini bersifat higroskopis, oleh karena itu kristal tersebut ditutup rapat dalam wadah alumunium yang dilapisi Kromium. Dalam wadah alumunium tersebut kristal NaI (Tl) dibungkus dengan reflektor yang biasanya adalah serbuk Mangan Oksida (MgO) atau Alumunium Trioksida (Al_2O_3) dan kemudian direkatkan pada sebuah *Photo Multiplier Tube* menggunakan perekat bening yang terbuat dari silikon (*silicon grease*). Hal ini dimaksudkan agar sintilasi yang dihasilkan sintilator dapat masuk ke dalam *Photo Multiplier Tube* tersebut. Di ujung *Photo Multiplier Tube* terdapat elektroda peka cahaya yang disebut fotokatoda, yang terbuat dari bahan yang peka cahaya dan mempunyai potensial ionisasi rendah sehingga apabila permukaannya terkena foton gamma maka akan dilepaskan elektron. Cacah dan tenaga gerak elektron yang dilepaskan ini bergantung pada intensitas dan tenaga sinar gamma yang mengenai sintilator. Makin tinggi tenaga sinar gamma, maka makin tinggi tenaga foton sintilasi yang dihasilkan dan makin tinggi pula tenaga gerak elektron yang dilepaskan fotokatoda. Hal ini dinyatakan dalam tinggi pulsa yang dihasilkan. Sinar gamma yang mempunyai tenaga tinggi akan menghasilkan pulsa yang tinggi, sedangkan sinar gamma yang mempunyai tenaga rendah akan menghasilkan pulsa yang rendah pula (*Coaching Radioisotop*, 2009).

2.1.4 Radionuklida Teknesium-99m (^{99m}Tc)

Dalam bidang radiofarmasi, ^{99m}Tc merupakan radionuklida yang dipakai secara luas dalam pembuatan radiofarmaka untuk tujuan diagnosis. Hal ini disebabkan oleh sifat-sifat dari ^{99m}Tc yang sesuai untuk tujuan diagnosis seperti memiliki mempunyai waktu paruh yang relatif pendek yaitu 6,02 jam, dan memancarkan sinar γ dengan energi sebesar 140 keV serta toksisitasnya rendah (Mahmood dan Jones, 2003).

Radiofarmaka yang ideal untuk pencitraan infeksi dan inflamasi memiliki kriteria-kriteria antara lain mudah dalam pembuatan, biaya produksi rendah, toksisitas rendah, memiliki spesifisitas tinggi, terlokalisasi secara cepat pada tempat terjadinya inflamasi, dan secara normal tidak terakumulasi dalam darah, hati, limpa, saluran cerna, tulang, sumsum tulang, ginjal, atau otot (Gnanasegaran, Croasdale, dan Buscombe, 2004).

Radionuklida ^{99m}Tc merupakan peluruhan radionuklida Molibdenum-99 (^{99}Mo). Secara umum, skema peluruhan ^{99}Mo sebagai radionuklida induk yang meluruh menjadi ^{99m}Tc sebagai radionuklida anak, dapat digambarkan sebagai berikut (*Coaching Radioisotop*, 2009):



[sumber: *Coaching Radioisotop*, 2009]

Gambar 2.3 Skema peluruhan radionuklida ^{99}Mo

Pemisahan ^{99m}Tc dari ^{99}Mo dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik atau dengan menggunakan generator. Pada penelitian ini, pemisahan ^{99m}Tc dari ^{99}Mo dilakukan dengan menggunakan generator kolom alumina, dimana ^{99}Mo diikatkan

pada kolom alumina, kemudian ^{99m}Tc dielusi dengan larutan NaCl fisiologis 0,9%. Radionuklida induk Na-molibdat akan terserap oleh alumina sedangkan ion $^{99m}\text{TcO}_4^-$ akan terelusi dari kolom dan turun bersama eluen. Bila ^{99m}Tc berada dalam bentuk $^{99m}\text{TcO}_2$ maka akan ikut tertahan bersama ^{99}Mo dalam alumina. Cara pemisahan ^{99m}Tc dari ^{99}Mo dengan cara ini sangat mudah hanya dengan mengelusi generator tersebut dengan larutan NaCl fisiologis 0,9%, kemudian eluat ditampung. Eluat ini adalah ^{99m}Tc dalam bentuk $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Teknesium perteknetat). Untuk tujuan penandaan sediaan radiofarmaka, radionuklida ^{99m}Tc biasanya disiapkan dalam bentuk larutan garam natrium perteknetat ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), karena bentuk ini paling stabil dengan tingkat oksidasi +7.

2.1.5 Kontrol Kualitas Radiofarmaka

Kontrol kualitas adalah segala kegiatan yang diperlukan untuk menjaga dan mengontrol apakah mutu radiofarmaka yang dihasilkan telah memenuhi syarat-syarat yang ditetapkan, sesuai dengan jenis dan maksud penggunaannya sehingga ada jaminan bagi pemakai. Penentuan kontrol kualitas meliputi pemeriksaan secara kimia, fisika, dan biologi. Pemeriksaan secara kimia terdiri dari pemeriksaan kemurnian radiokimia, pH, kadar logam berat, dan tonisitas. Sedangkan pemeriksaan secara fisika meliputi pemeriksaan visual, kemurniaan radionuklida, konsentrasi radioaktif, dan radioaktivitas. Dalam pemeriksaan secara biologi, diuji sterilitas, apirogenitas, toksisitas, dan distribusi dalam organ binatang percobaan (khusus untuk radiofarmaka baru) (*Coaching Radioisotop*, 2009).

2.1.5.1 Uji Kemurnian Radiokimia

Kromatografi Lapis Tipis Instant (*Instant Thin Layer Chromatography*, ITLC)

Kontrol kualitas dari radiokimia didapat dengan cara menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Instant. Lempeng KLT Instant merupakan fase diam yang sering digunakan dalam kedokteran nuklir. Metode ini digunakan untuk menganalisis kemurnian radiokimia dari suatu radiofarmaka dengan cepat dan akurat. Lempeng KLT Instant terbuat dari fiberglas, dilapisi oleh adsorben,

Universitas Indonesia

biasanya silika gel (SG). Bahan penyaring KLT Instant yang lebih halus menyebabkan proses migrasi dengan KLT Instant meningkat berkali-kali lipat dari KLT biasa. Waktu yang dibutuhkan untuk proses migrasi pun menjadi berkurang tanpa mempengaruhi pemisahan dari pengotor radiokimia. Proses pemisahan dari silika gel tergantung dari eluen yang digunakan. Ketika digunakan eluen pelarut organik, maka direkomendasikan untuk mengeringkan lempeng KLT Instant sebelum digunakan dengan memanaskan di dalam oven 110°C selama 10-20 menit. Kebanyakan pengotor dari radiofarmaka tetap berada di batas awal ($R_f = 0$) atau berpindah ke batas akhir ($R_f = 0,8-1,0$). Untuk memisahkan dan mengidentifikasi dua atau lebih pengotor, biasanya digunakan dua atau lebih sistem analisis.

Jika digunakan pelarut organik untuk proses pemisahan, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tereduksi ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) dan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -kompleks akan tetap tinggal di batas awal ($R_f = 0$), serta perteknetat bebas ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) akan bermigrasi ke batas akhir ($R_f = 0,8-1,0$). Sistem ini cocok untuk menentukan jumlah $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$). Dalam larutan NaCl fisiologis 0,9%, perteknetat bebas dan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -kompleks akan bermigrasi ke batas akhir ($R_f = 0,8-1,0$), dan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tereduksi ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) akan tetap tinggal di batas awal ($R_f = 0$). Sistem ini cocok untuk menentukan jumlah $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tereduksi ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) (Zolle, 2007).

Kemurnian $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dilakukan dengan mengelusi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin pada kertas Whatman 1 dengan fase gerak Etil Metil Keton selama 5 hingga 30 menit, dan memberikan persentase kemurnian $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin hingga 95% dengan persentase pengotor kurang dari 5% perteknetat bebas ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) dan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tereduksi ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) (Britton et al., 2002).

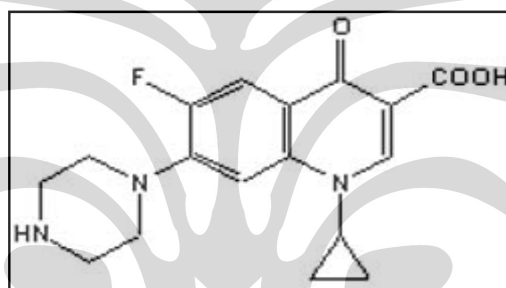
2.1.5.2 Uji Sterilitas Radiofarmaka

Prosedur pengujian terdiri dari inokulasi langsung ke dalam media uji dan teknik penyaringan membran. Uji sterilitas untuk bahan farmakope, jika mungkin menggunakan penyaringan membran merupakan metode pilihan. Prosedur ini terutama berguna untuk cairan dan serbuk yang dapat larut dan bersifat bakteristatik atau fungistatik, untuk memisahkan mikroba kontaminan dari penghambat pertumbuhan. Prosedur uji inokulasi langsung ke dalam media uji

yaitu dengan memindahkan cairan dalam wadah uji menggunakan jarum suntik steril. Secara aseptik, sejumlah tertentu bahan dari tiap wadah uji diinokulasikan ke dalam tabung media selanjutnya diinkubasi selama tidak kurang dari 14 hari. Pertumbuhan pada media diamati secara visual sesering mungkin sekurangnya pada hari ke-3 atau ke-4 atau ke-5, pada hari ke-7 atau ke-8 dan pada hari terakhir dari masa uji (Farmakope Indonesia, 1995).

2.1.6 Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Antibiotik siprofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon yang bekerja dengan cara menghambat enzim DNA *gyrase* pada replikasi DNA sehingga akan menghambat replikasi DNA dan transkripsi mRNA (Setiabudy, 1995).

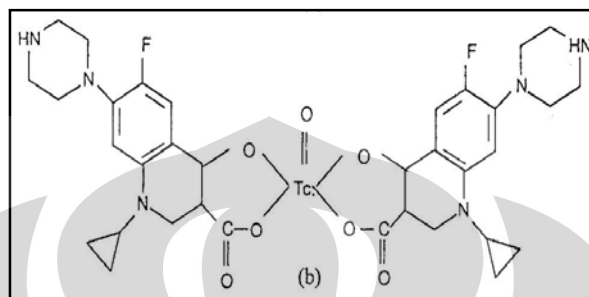


[sumber: *The Merck Index*, 2001]

Gambar 2.4 Struktur Kimia Siprofloksasin

Sejak tahun 1998, ^{99m}Tc -siprofloksasin mulai dikembangkan untuk meningkatkan spesifitas dalam diagnosis infeksi. ^{99m}Tc -siprofloksasin terdiri dari siprofloksasin yang merupakan antibiotik berspektrum luas, yang diikatkan dengan radionuklida ^{99m}Tc (Sonmezoglu et al., 2001). Reaksi antara siprofloksasin dengan radionuklida ^{99m}Tc membentuk suatu kompleks khelat dengan atom Teknesium sebagai atom pusatnya (Basry dan Zainuddin, 2005). Dalam pembentukan suatu kompleks khelat tersebut, diperlukan adanya suatu bahan reduktor yang menurunkan bilangan oksidasi Tc^{+7} menjadi lebih rendah. Reduktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sn (II) dan asam tartrat. Sn (II) berfungsi sebagai reduktor yang menurunkan bilangan oksidasi ^{99m}Tc menjadi bilangan oksidasi yang rendah, sedangkan asam tartrat digunakan sebagai *ligand*

exchange (Sriyani dan Zainuddin, 2009). Asam tartrat akan mengikat ^{99m}Tc , membentuk kompleks ^{99m}Tc -tartrat. Molekul tartrat yang telah berikatan dengan atom ^{99m}Tc akan digantikan dengan atom ^{99m}Tc yang diikat oleh dua molekul siprofloksasin membentuk suatu kompleks khelat dengan struktur sebagai berikut:



[sumber: Basry dan Zainuddin, 2005]

Gambar 2.5 Struktur kimia kompleks ^{99m}Tc -siprofloksasin

Reaksi penandaan siprofloksasin dengan radionuklida ^{99m}Tc dapat menyebabkan perubahan struktur molekul dari siprofloksasin tersebut. Adanya atom O (Oksigen) yang mempunyai pasangan elektron dalam molekul siprofloksasin memungkinkan senyawa tersebut membentuk kompleks dengan ^{99m}Tc , dimana pasangan elektron bebas ini akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan radionuklida tersebut (Gano et al., 1998)

2.2 Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

2.2.1 *Escherichia coli* (Karsinah, 1994)

Escherichia coli adalah bakteri berbentuk batang pendek dengan ukuran $0,5 \mu\text{m} \times 3,0 \mu\text{m}$, gram negatif, tidak berspora, sebagian besar gerak positif dengan flagel peritrik dan beberapa strain mempunyai kapsul berupa selubung tipis. *Escherichia coli* tumbuh baik pada hampir semua medium yang biasa dipakai di laboratorium mikrobiologi, medium yang dipergunakan untuk isolasi bakteri enterik, sebagian besar strain *Escherichia coli* tumbuh sebagai koloni yang meragi laktosa. *Escherichia coli* bersifat mikroaerofilik. Beberapa *strain* bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe beta.

Klasifikasi *Escherichia coli*:

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Suku : Enterobacteriaceae
Genus : Escherichia
Spesies: *Escherichia coli*

2.2.2 *Staphylococcus aureus* (Warsa, 1994)

Staphylococcus aureus berbentuk sferis, bila menggerombol dalam susunan yang tidak teratur mungkin sisinya agak rata karena tertekan. Diameter bakteri antara 0,8-1,0 mikron. Bakteri ini tidak bergerak, tidak berspora dan gram positif. *Staphylococcus aureus* tumbuh dengan baik dalam kaldu biasa pada suhu 37°C. Pertumbuhan terbaik dan khas ialah pada suasana aerob. Bakteri ini pun bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen dan pH optimum untuk pertumbuhan ialah 7,4. Pada lempeng agar, koloninya berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, cembung, mengkilat, dan konsistensinya lunak. Warna khas ialah kuning keemasan, hanya intensitas warnanya dapat bervariasi.

Klasifikasi *Staphylococcus aureus*:

Divisi : Protophyta
Kelas : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Suku : Micrococcaceae
Genus : Staphylococcus
Spesies: *Staphylococcus aureus*

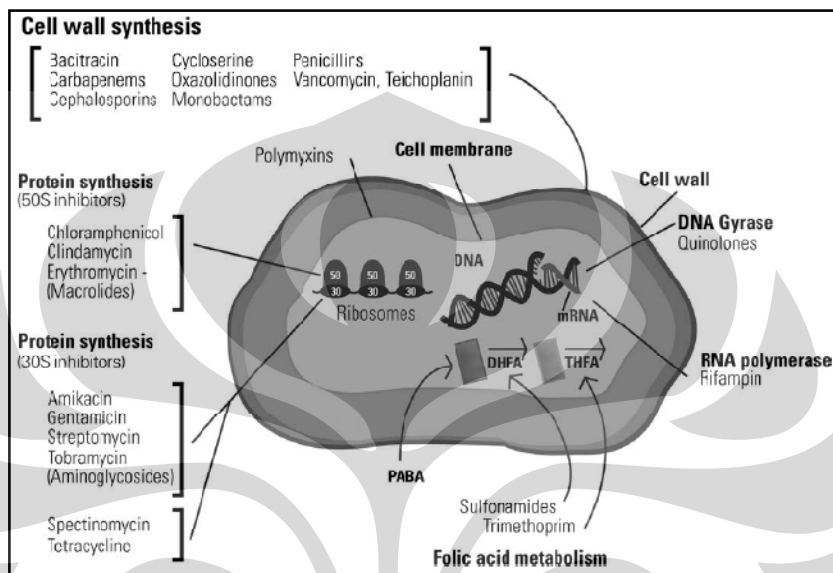
2.3 Antibiotik Kotrimoksazol (Mariana dan Setiabudy, 1995)

Kotrimoksazol merupakan suatu kombinasi yang terdiri dari sulfametoksazol dan trimetoprim dengan perbandingan 5 : 1. Sulfametoksazol dan trimetoprim menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergi.

Aktivitas antibakteri kotrimoksazol berdasarkan atas kerjanya pada dua tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk asam tetrahidrofolat.

Universitas Indonesia

Sulfonamid menghambat masuknya molekul PABA ke dalam molekul asam folat dan trimetoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Trimetoprim menghambat enzim dihidrofolat reduktase mikroba secara sangat selektif.



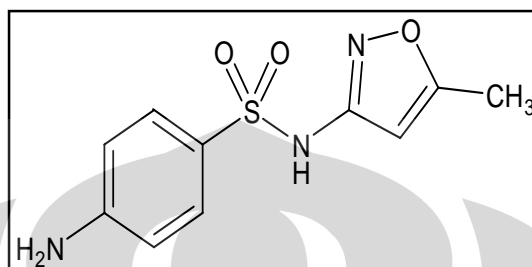
[sumber: Andersson, 2005]

Gambar 2.6 Mekanisme kerja beberapa antibiotik terhadap bakteri

Spektrum antibakteri trimetoprim sama dengan sulfametoksazol, meskipun daya bakterinya 20-100 kali lebih kuat daripada sulfametoksazol. Mikroba yang peka terhadap kombinasi sulfametoksazol-trimetoprim ialah *Corynebacterium diphtheria*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella sp.*, dan *Shigella dysenteriae*. Kotrimoksazol biasanya digunakan sebagai pengobatan dari infeksi saluran kemih, infeksi saluran cerna, infeksi saluran napas, infeksi genitalia, infeksi oleh *Pneumocystis carinii*. Frekuensi terjadinya resistensi terhadap kotrimoksazol lebih rendah daripada masing-masing obat, karena mikroba yang resisten terhadap salah satu komponen masih peka terhadap komponen lainnya. Resistensi mikroba terhadap trimetoprim dapat terjadi karena mutasi. Resistensi

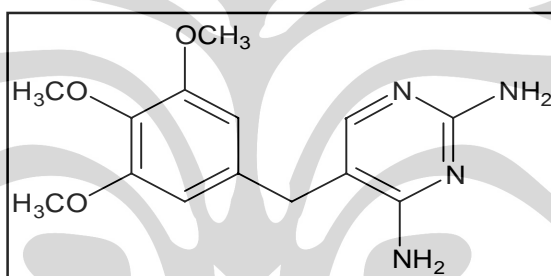
yang terjadi pada bakteri gram negatif disebabkan oleh adanya plasmid yang membawa sifat menghambat kerja obat terhadap enzim dihidrofolat reduktase.

Struktur kimia dari sulfametoksazol dan trimetoprim adalah sebagai berikut:



[sumber: *The Merck Index*, 2001]

Gambar 2.7 Struktur kimia sulfametoksazol



[sumber: *The Merck Index*, 2001]

Gambar 2.8 Struktur kimia trimetoprim

Infus intravena kotrimoksazol (*British Pharmacopoeia*, 2007) adalah larutan steril yang terdiri dari trimetoprim dan derivat Natrium dari sulfametoksazol. Injeksi ini dipreparasi segera sebelum digunakan dengan melarutkan konsentrat kotrimoksazol steril ke dalam infus intravena glukosa atau NaCl. Sedangkan yang disebut konsentrat kotrimoksazol steril adalah larutan steril dari trimetoprim dan sulfametoksazol-Na, hasil dari interaksi antara sulfametoksazol dan NaOH dalam perbandingan 1 : 5 dalam air untuk injeksi yang mengandung 40-45% v/v propilenglikol.

2.4 Uji Antimikroba

Untuk mengetahui efek antibakteri secara *in vitro* dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain (Kristanti, 2008) :

1. Metode Difusi (*Diffusion Method*)
 - a) Metode cakram kertas (*Disc Diffusion Method*)
 - b) Metode cairan dalam cincin (*Ring Diffusion Method*)
 - c) Metode sumuran (*Well Diffusion Method*)

Prosedur yang biasa digunakan untuk menentukan potensi antibiotik adalah metode difusi dengan cakram. Pada uji ini, respon bakteri secara *in vitro* terhadap cakram yang berisi antibiotik dikorelasikan dengan respon klinis dari pasien yang diberikan antibiotik tersebut. Zona hambatan disekitar cakram dikorelasikan dengan konsentrasi hambat minimum dari agen antimikroba, seperti pada uji menggunakan metode pengenceran dalam tabung.

2. Metode Pengenceran (*Dilution Method*)
 - a) Metode pengenceran obat dalam agar (*Agar Dilution Method*)
 - b) Metode pengenceran obat dalam tabung (*Tube Dilution Method*)

Pada metode ini, disiapkan beberapa seri dari tabung yang berisi medium cair dan agen kemoterapi dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Tabung-tabung tersebut kemudian diinokulasi dengan mikroorganisme dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Setelah inkubasi, tabung-tabung tersebut diamati pertumbuhan bakteri. Konsentrasi terendah dari agen kemoterapi yang menghambat pertumbuhan bakteri disebut Kadar Hambat Minimum (KHM).

2.5 Resistensi

Saat ini, hampir 70% bakteri yang menyebabkan infeksi di rumah sakit telah resisten terhadap setidaknya satu antibiotik yang umum digunakan sebagai terapi. Beberapa bakteri yang resisten bahkan hanya bisa disembuhkan dengan antibiotik yang bersifat lebih toksik.

Resistensi didefinisikan sebagai kemampuan alami organisme normal untuk tetap tidak berpengaruh oleh agen berbahaya yang ada di lingkungan (Kumala dan Nuswantari, 1998). Resistensi bakteri terhadap antibiotik terjadi bila bakteri mengalami perubahan sedemikian rupa yang dapat mengurangi efek dari suatu

antibiotik yang ditujukan untuk mencegah atau mengobati suatu infeksi sehingga bakteri dapat terus bertahan hidup dan berkembang biak. Penggunaan antibiotik secara luas menyebabkan peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Kerentanan bakteri terhadap agen antibakteri diperoleh dengan cara menentukan kadar hambat minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Bari, Mahajan, dan Surana, 2008).

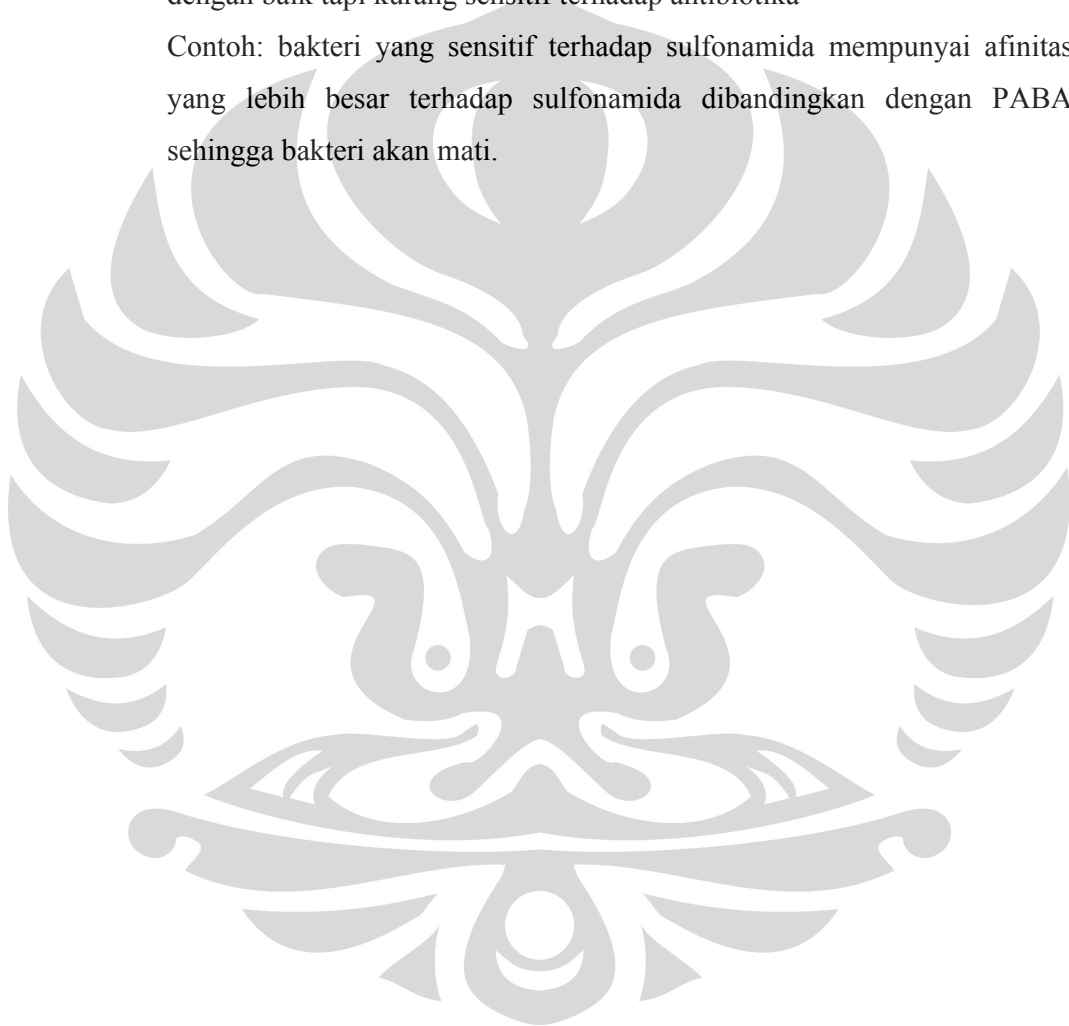
Infeksi yang disebabkan oleh bakteri resisten dapat mengakibatkan kegagalan terapi yang dapat memperlambat kesembuhan penyakit, dan memperbesar resiko kematian. Apabila suatu infeksi telah resisten terhadap antibiotik lini pertama, maka terapi antibiotik akan diganti dengan antibiotik lini kedua atau ketiga, yang umumnya lebih mahal dan lebih toksik dibanding antibiotik lini pertama (Bisht, Katiyar, Singh, dan Mittal, 2009). Sebanyak 80% infeksi diterapi menggunakan antibiotik dan sebagian besar diantaranya digunakan untuk indikasi yang tidak tepat, seperti misalnya untuk infeksi akibat virus. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan terjadinya resistensi bakteri terhadap suatu antibiotik.

Ada berbagai mekanisme yang menyebabkan suatu populasi bakteri menjadi resisten terhadap antibiotika. Mekanisme tersebut antara lain adalah (Sudarmono, 1994):

1. Mikroorganisme memproduksi enzim yang merusak daya kerja obat
Contoh: *Staphylococcus* resisten terhadap penisilin disebabkan karena *Staphylococcus* memproduksi enzim beta laktamase yang memecahkan cincin dari penisilin, sehingga penisilin tidak lagi aktif bekerja.
2. Terjadinya perubahan permeabilitas bakteri terhadap obat tertentu
Contoh: beberapa bakteri tertentu mempunyai barier khusus terhadap golongan obat, golongan aminoglikosida.
3. Terjadinya perubahan pada tempat atau lokus tertentu di dalam sel sekelompok mikroorganisme tertentu yang menjadi target dari obat
Contoh: obat golongan aminoglikosida memecah atau membunuh bakteri karena obat ini merusak sistem ribosom subunit 30 S. Jika oleh suatu hal lokus kerja obat pada ribosom 30 S berubah, maka bakteri tidak lagi sensitif terhadap golongan obat ini.

Universitas Indonesia

4. Terjadinya perubahan pada *metabolic pathway* yang menjadi target obat
Contoh: bakteri yang resisten terhadap obat golongan sulfonamida, tidak memerlukan PABA dari luar sel, tapi dapat menggunakan asam folat sehingga sulfonamida yang berkompetisi dengan PABA tidak berpengaruh apa-apa.
5. Terjadi perubahan enzimatik sehingga bakteri meskipun masih dapat hidup dengan baik tapi kurang sensitif terhadap antibiotika
Contoh: bakteri yang sensitif terhadap sulfonamida mempunyai afinitas yang lebih besar terhadap sulfonamida dibandingkan dengan PABA sehingga bakteri akan mati.



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi serta Laboratorium Sintesis Senyawa Bertanda PTNBR BATAN Bandung. Penelitian dilakukan dari bulan Februari hingga bulan Mei 2010.

3.2 Bahan

1. Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* yang mewakili gram positif dan *Escherichia coli wild-type* yang mewakili gram negatif, yang merupakan koleksi dari laboratorium Mikrobiologi ITB.

2. Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan penelitian ini antara lain radionuklida ^{99m}Tc dalam bentuk larutan $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ yang diperoleh dari generator $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ buatan BATAN-Teknologi (Gambar 3.1), Siprofloksasin HCl (Zhejiang Xianju Shifang Pharmaceutical, China), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Jerman), Asam tartrat (Merck, Jerman), Sulfametoksazol (Virchow Laboratories Limited, India), Trimetoprim (Shouguang Fukang Pharmaceutical, China), kertas ITLC-SG berukuran 1x10 cm (Pall Corporation, USA), kertas kromatografi Whatman 1 berukuran 1x10 cm (Gelman, USA), Natrium hidroksida (Merck, Jerman), Asam hidroklorida (Merck), Natrium klorida fisiologis 0,9% (IPHA Laboratories), propilenglikol, Etil Metil Keton (Merck, Jerman), Etanol (Merck, Jerman), ammonia (Merck, Jerman), Aquabidest steril pro injeksi (IPHA Laboratories, Indonesia), Larutan Karbol Kristal Ungu 0,5 % , Lugol 0,5 % , alkohol 96 % , Fukhsin.

3. Medium

Medium-medium yang digunakan dalam penelitian ini antara lain medium padat Nutrient Agar (Oxoid, Inggris), medium cair Tioglikolat (Merck, Jerman), medium padat Mueller-Hinton Agar (Oxoid, Inggris).

3.3 Alat

Alat yang digunakan antara lain pencacah saluran tunggal (*Single Channel Analyzer*) (Ortec) dengan detektor NaI (TI) (Gambar 3.2), *Dose Calibrator* (Victoreen) (Gambar 3.3), Autoklaf (Hirayama), *Laminar Air Flow* (BBL Biological Cabinet, Becton Dickinson), inkubator (Mettmert), oven (Mettmert), *Shaker Incubator* (Karl Kolb), peralatan kromatografi menaik, sentrifuge (Fischer-1328), timbangan analitik (Mettler), *Freeze-dryer* (Labconco), vortex (Retsch Mixer), kontainer timbal (Gambar 3.4), penyaring bakteri (Milipore 0,22 μm), jangka sorong (Vernier Caliper), alat pembuat sumuran berdiameter 6 mm yang terbuat dari *stainless steel*, vial steril 10 ml dan 25 ml, kertas indikator universal (Merck, Jerman), spuit, cawan petri, ose, mikropipet (Eppendorf), dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam Laboratorium Mikrobiologi.

3.4 Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan Medium dan Larutan Pereaksi

a. Pembuatan medium Nutrient Agar (NA)

Bubuk NA ditimbang sebanyak 23 gram dan dilarutkan ke dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan untuk meningkatkan kelarutan. Setelah larut, medium disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Untuk membuat agar miring, tabung-tabung reaksi yang telah berisi NA yang steril dalam posisi miring dan dibiarkan membeku. Untuk membuat agar petri, medium NA di dalam Erlenmeyer yang telah disterilisasi didinginkan sampai suhu 50-60° C, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri secara aseptis masing-masing sebanyak 15 ml dan didinginkan. Medium yang telah siap dan tidak segera dipakai sebaiknya disimpan di dalam lemari pendingin (suhu 8-10° C).

b. Pembuatan medium Mueller-Hinton Agar (MHA)

Bubuk MHA sebanyak 38 gram ditimbang dan dilarutkan ke dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan untuk meningkatkan kelarutan. Setelah larut sempurna, medium disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15

menit. Medium yang telah disterilisasi didinginkan sampai suhu 50-60° C, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri secara aseptis masing-masing sebanyak 20 ml dan didinginkan. Medium yang telah siap dan tidak segera dipakai sebaiknya disimpan di dalam lemari pendingin (suhu 8-10° C).

c. Pembuatan medium cair Tioglikolat

Bubuk Tioglikolat sebanyak 29 gram ditimbang dan dilarutkan ke dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan untuk meningkatkan kelarutan. Setelah larut sempurna, medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 0,8 ml dan ditutup dengan sumbat. Kemudian seluruh tabung reaksi disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Medium yang telah siap dan tidak segera dipakai sebaiknya disimpan di dalam lemari pendingin (suhu 8-10° C).

d. Pembuatan larutan NaOH 1 N

Sebanyak ± 4,0 g Natrium hidroksida ditimbang secara seksama dan dilarutkan dengan aquadest hingga tepat 100 ml.

3.4.2. Sintesis Kit-Kering Siprofloksasin

a. Pembuatan larutan siprofloksasin HCl, larutan SnCl₂.2H₂O, dan larutan asam tartrat.

Sebanyak 40,0 mg siprofloksasin HCl, 7,5 mg SnCl₂.2H₂O, dan 7,5 mg asam tartrat ditimbang. Siprofloksasin HCl yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam vial 25 ml yang steril, kemudian dilarutkan dalam 20,0 ml NaCl fisiologis dan dikocok hingga larut sempurna. Larutan ini selanjutnya disebut larutan siprofloksasin HCl. Selanjutnya SnCl₂.2H₂O yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam vial 10 ml yang steril dan dilarutkan dalam 5,0 ml HCl 0,01 N dan dikocok hingga larut sempurna. Dari larutan tersebut diambil 1,0 ml, dimasukkan ke dalam vial 10 ml steril yang lain dan ditambahkan hingga 3,0 ml HCl 0,01 N. Larutan ini selanjutnya disebut larutan SnCl₂.2H₂O. Dalam vial 10 ml steril yang berbeda, asam tartrat yang telah ditimbang dilarutkan dalam 5,0 ml aquadest bebas O₂ dan dikocok hingga larut sempurna. Dari larutan tersebut, diambil 20 µl, dimasukkan

ke dalam vial 10 ml steril yang lain, dan ditambahkan 5,0 ml aquadest bebas O₂. Larutan ini selanjutnya disebut larutan asam tartrat.

b. Sintesis Kit-kering Siprofloksasin

Sintesis kit-kering siprofloksasin dilakukan secara aseptis di bawah *Laminar Air Flow*. Sebanyak 20,0 ml larutan siprofloksasin HCl ditambahkan 2,0 ml larutan SnCl₂·2H₂O dan 2,0 ml larutan asam tartrat. Selanjutnya pH larutan diatur agar tercapai pH = 3 dengan penambahan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N. Kemudian divortex selama ± 40 detik agar tercampur sempurna. Larutan disaring menggunakan penyaring bakteri dan dibagi masing-masing 1,2 ml ke dalam 16 buah vial 10 ml steril. Kemudian ditutup dengan posisi setengah terbuka dan dikeringkan dengan cara liofilisasi. Kit-kering siprofloksasin telah siap dan tidak segera dipakai sebaiknya disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu ± 4° C.

3.4.3. Pengujian Sterilitas Kit-Kering Siprofloksasin

Satu buah vial kit-kering siprofloksasin dari hasil liofilisasi dilarutkan dengan 1,0 ml larutan NaCl fisiologis. Pada medium padat, larutan tersebut diteteskan pada 3 titik yang telah ditandai pada medium Nutrient Agar. Sedangkan untuk medium cair, larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium cair Tioglikolat. Pengujian sterilitas dilakukan secara duplo dan aseptis dibawah *Laminar Air Flow*. Kemudian masing-masing medium Nutrient Agar dan Tioglikolat diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C dan dipantau setiap hari selama 7 hari dan dilihat ada tidaknya pertumbuhan mikroba.

3.4.4. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* wild-type

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* wild-type dilakukan dengan cara perwarnaan Gram. Sediaan bakteri dibuat pada gelas objek dan difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api. Larutan Karbol Kristal Ungu 0,5 % dituangkan pada sediaan dan dibiarkan selama 5 menit. Selanjutnya, dilakukan pencucian dengan aquadest. Pada sediaan dituangkan cairan Lugol 0,5 % selama 45-60 detik, kelebihan zat warna dibuang, dan sediaan dicuci dengan

aquadest serta dilakukan juga pencucian dengan alkohol dengan cara mencelupkan sediaan dalam bejana berisi alkohol 96 % dan digoyang-goyangkan selama 30 detik, atau sampai zat warna tidak mengalir lagi. Kemudian dilakukan pencucian dengan aquadest. Setelah itu, air Fukhsin dituangkan pada sediaan, dibiarkan selama 1-2 menit, dan kelebihan zat warna dibuang, kemudian sediaan dicuci dengan aquadest. Sisa-sisa air diserap menggunakan kertas serap. Pengamatan bentuk dan warna sel bakteri dilihat di bawah mikroskop. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu biru, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna ungu merah.

3.4.5. Peremajaan Bakteri dan Pembuatan Kultur Kerja *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type*

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type* yang berada dalam kultur stok beku masing-masing diremajakan kembali. Kawat ose dicelupkan ke dalam alkohol dan dipanaskan di atas lampu spiritus sampai membara. Setelah dingin, kawat ose digunakan untuk mengambil bakteri di dalam kultur stok. Bakteri yang berada pada kawat ose dipindahkan ke dalam agar miring dan selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam. Untuk pembuatan kultur kerja, masing-masing bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type* dari agar miring dipindahkan ke dalam cawan petri secara aseptis dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam untuk langsung digunakan keesokan harinya.

3.4.6. Pembuatan Inokulum Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type*

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type* yang telah diremajakan dalam cawan petri masing-masing diambil dengan ose dan diencerkan ke dalam 5 ml NaCl fisiologis 0,9%. Suspensi bakteri tersebut divortex dan kekeruhannya disesuaikan dengan larutan Mc.Farland yang setara dengan 10⁷ bakteri/ml. Larutan Mc.Farland 10⁷ bakteri/ml merupakan hasil pengenceran dari larutan Mc.Farland III (setara dengan 10⁹ bakteri/ml) yang berisi 0,3 ml BaCl₂ dan 9,7 ml H₂SO₄.

3.4.7. Pembuatan Larutan Antibiotik Kotrimoksazol

Antibiotik kotrimoksazol terdiri dari sulfametoksazol dan trimetoprim dengan perbandingan 5: 1. Sulfametoksazol dan trimetoprim ditimbang sebanyak masing-masing 80,0 mg dan 16,0 mg. Trimetoprim dilarutkan dalam 4 ml propilenglikol dan sulfametoksazol dilarutkan dalam 1 ml NaOH 1 N. Setelah larut sempurna, kedua larutan dimasukkan dalam labu takar 10,0 ml dan dikocok hingga larut sempurna. Selanjutnya, pH larutan tersebut diatur agar tercapai pH 9,5-10 dengan menambahkan NaOH 0,1 N. Setelah pH yang diinginkan tercapai, larutan tersebut diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% hingga batas sehingga diperoleh larutan induk kotrimoksazol 9600 ppm. Setelah diperoleh larutan induk, dibuat seri pengenceran kelipatan dua sehingga diperoleh konsentrasi sebagai berikut: 4800 ppm; 2400 ppm; 1200 ppm; 600 ppm; 300 ppm; 150 ppm; 75 ppm; 37,50 ppm; 18,75 ppm; 9,38 ppm; 4,69 ppm; dan 2,34 ppm.

3.4.8. Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type*

Sebanyak 16 tabung reaksi (untuk 13 konsentrasi dan 3 buah kontrol) yang telah berisi 0,8 ml medium cair Tioglikolat disiapkan dan diisi dengan 0,1 ml suspensi bakteri masing-masing *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type* (setara dengan 10^7 bakteri/ml). Sebanyak 0,1 ml larutan antibiotik hasil pengenceran dimasukkan pada setiap tabung reaksi dengan konsentrasi yang berbeda. Kemudian, seluruh tabung divortex dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan secara triplo. Sebagai kontrol, digunakan 3 buah kontrol, yaitu kontrol bakteri (0,8 ml media cair Tioglikolat; 0,1 ml suspensi bakteri; dan 0,1 ml pelarut), kontrol antibiotik (0,8 ml media cair Tioglikolat; 0,1 ml larutan induk antibiotik kotrimoksazol; dan 0,1 ml pelarut), dan kontrol media (0,8 ml media cair Tioglikolat; dan 0,2 ml pelarut). Konsentrasi hambat minimum ditunjukkan dari konsentrasi obat terkecil yang menghasilkan kejernihan yang pertama. Konsentrasi-konsentrasi yang masih menghasilkan kekeruhan akan digunakan selanjutnya untuk menentukan konsentrasi yang membuat bakteri resisten.

3.4.9. Proses Peresistenan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type*

Dari hasil penentuan KHM bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type* sebelumnya, tabung-tabung yang masih menunjukkan kekeruhan dilanjutkan pemberian antibiotik kotrimoksazol selama empat hari berturut-turut untuk *Escherichia coli wild-type* dan lima hari berturut-turut untuk *Staphylococcus aureus wild-type* dengan konsentrasi yang sama dengan konsentrasi pemberian hari ke-1 sebanyak 0,1 ml, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C.

3.4.10. Pengujian Kepekaan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type* terhadap Antibiotik Kotrimoksazol

Mueller Hinton Agar disiapkan dan dibuat sumur-sumur dengan sumuran logam berdiameter 6 mm yang terbuat dari *stainless steel*. Masing-masing bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli wild-type* yang berada dalam tabung hasil peresistenan ditanam ke dalam Mueller Hinton Agar tersebut. Sebanyak 20 µl larutan antibiotik kotrimoksazol sebesar KHM dimasukkan ke dalam sumuran. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, zona hambatan yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Bakteri yang memiliki zona hambatan lebih kecil dari kontrol bakteri atau tidak memiliki zona hambat dianggap telah resisten dan ditanam ke cawan petri yang berisi Nutrient Agar (NA) yang berisi antibiotik kotrimoksazol dengan konsentrasi kadar hambat minimumnya.

3.4.11. Penandaan Kit-Kering Sipprofloksasin dengan Radionuklida ^{99m}Tc

Ke dalam kit-kering sipprofloksasin ditambahkan 1,5 ml larutan $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ dengan aktivitas 2-13 mCi, selanjutnya divortex hingga larut sempurna (± 40 detik) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Setelah diinkubasi, radiofarmaka ^{99m}Tc -sipprofloksasin dicek pH dan aktivitasnya. Selanjutnya diuji kemurnian radiokimia dari ^{99m}Tc -sipprofloksasin.

3.4.12. Pengujian Kemurnian Radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin

Masing-masing tiga buah kertas kromatografi Whatman 1 dan ITLC-SG berukuran 1 x 10 cm disiapkan. Masing-masing kertas kromatografi ditandai satu buah untuk $^{99m}\text{TcO}_4$ dan dua buah untuk ^{99m}Tc -siprofloksasin, yang telah diberi nomor -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8. Selanjutnya, kertas kromatografi tersebut dikeringkan terlebih dahulu didalam oven pada suhu 80°C selama 15 menit. Setelah kering, pada kertas Whatman 1 ditotolkan kurang lebih $4\ \mu\text{l}$ $^{99m}\text{TcO}_4$ pada kertas pertama dan ^{99m}Tc -siprofloksasin pada kertas kedua dan ketiga. Selanjutnya dilakukan prosedur yang sama pada ITLC-SG. Selanjutnya kertas kromatografi dielusi dengan fase gerak yang sesuai yaitu campuran dari etanol, aquabidest, dan ammonia (2 : 5 : 1) untuk ITLC-SG dan Etil Metil Keton untuk Whatman 1.

Setelah proses elusi selesai, kertas kromatografi dikeringkan di dalam oven dengan suhu 80°C selama 15 menit. Setelah kering, kertas kromatografi dipotong-potong sepanjang 1 cm (Gambar 3.5), kemudian dicacah dengan pencacah saluran tunggal dengan detektor NaI (TI). Dari cacahan yang diperoleh dapat dihitung persentase pengotor yang berupa $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dan $^{99m}\text{TcO}_2$. Untuk menghitung cacahan digunakan alat pencacah saluran tunggal yang dihubungkan ke komputer yang menggunakan program Sistem Pencacah untuk *Single Channel Analyzer* (SCA) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Mempersiapkan alat pencacah saluran tunggal. Untuk radionuklida ^{99m}Tc , *high voltage* di setel 800 V, window 0,6; lower level 1,0; dan waktu pencacahan 4 detik
2. Membuat folder dengan format nama: *uptake_*nama radiofarmaka_ tanggal, bulan, dan tahun pencacahan
3. Meng-copy aplikasi “Sistem Pencacah untuk SCA” ke dalam folder yang telah dibuat
4. Membuka aplikasi “Sistem Pencacah untuk SCA”, lalu di-klik pilihan “Cch_SBR” (Gambar 3.6) dan diisi keterangan tentang bahan yang akan dicacah
5. Mencacah tabung reaksi kosong sebagai *background* (latar belakang) (Gambar 3.7). Jika radiasi latar belakang melebihi 10 cps, digunakan tabung reaksi lain yang memiliki radiasi latar belakang kurang dari 10 cps

6. Mencacah sampel yang berupa potongan-potongan kertas kromatografi berukuran 1 cm yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diukur sebagai latar belakang (Gambar 3.8). Pencacahan dimulai dari nomor -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hingga nomor 8
7. Setelah selesai, aplikasi akan menyimpan secara otomatis (Gambar 3.9) dan hasilnya terlihat seperti Gambar 3.10

3.4.13. Penentuan *Uptake* ^{99m}Tc -siprofloksasin oleh Bakteri *Escherichia coli* *wild-type* yang Resistan Antibiotik Kotrimoksazol

Sebanyak 60 μL radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml larutan NaCl fisiologis 0,9% mengandung bakteri *Escherichia coli* resisten kotrimoksazol yang setara dengan 10^7 bakteri/ml. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam didalam *shaker-incubator*. Setelah diinkubasi, bakteri dimatikan dengan cara dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Kemudian disentrifugasi selama \pm 5 menit, dihasilkan fraksi filtrat dan endapan yang selanjutnya dipisahkan. Fraksi endapan ditambahkan 1 ml larutan NaCl fisiologis 0,9%. Selanjutnya campuran divortex, disentrifuge selama \pm 5 menit dan dipisahkan kembali filtrat dan endapannya. Proses ini diulang sebanyak dua kali. Masing-masing fraksi endapan dan filtrat dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Larutan $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ digunakan sebagai kontrol.

3.4.14. Penentuan *Uptake* ^{99m}Tc -siprofloksasin oleh Bakteri *Staphylococcus aureus* *wild-type* yang Resistan Antibiotik Kotrimoksazol

Sebanyak 60 μL radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl fisiologis 0,9% mengandung bakteri *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik kotrimoksazol yang setara dengan 10^7 bakteri/ml. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam didalam *shaker-incubator*. Setelah diinkubasi, bakteri dimatikan dengan cara dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Kemudian disentrifugasi selama \pm 5 menit, dihasilkan fraksi filtrat dan endapan yang selanjutnya dipisahkan. Fraksi endapan ditambahkan 1 ml larutan NaCl fisiologis 0,9%.

Selanjutnya campuran divortex, disentrifuge selama ± 5 menit dan dipisahkan kembali filtrat dan endapannya. Proses ini diulang sebanyak dua kali. Masing-masing fraksi endapan dan filtrat dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Larutan $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ digunakan sebagai kontrol.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sintesis Kit-Kering Siprofloksasin

Hasil sintesis kit-kering siprofloksasin setelah melalui proses liofilisasi akan menjadi serbuk berwarna putih dalam vial yang vakum dan steril, terpisah dari radionuklidanya.

Untuk penelitian ini dibuat 16 vial kit-kering siprofloksasin. Kit-kering siprofloksasin stabil hingga 5 bulan penyimpanan pada suhu $\pm 4^{\circ}$ C (Zainuddin, Basry, Iljas dan Suminar, 2009). Satu vial kit-kering siprofloksasin terdiri dari siprofloksasin HCl, asam tartrat sebagai *exchange ligand* dan $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai reduktor.

4.2 Pengujian Sterilitas Kit-Kering Siprofloksasin

Kit kering siprofloksasin yang dibuat dinyatakan steril karena tidak terdapat pertumbuhan mikroba setelah diinkubasi selama tujuh hari pada medium padat Nutrient agar dan medium cair Tioglikolat.

Metode yang digunakan untuk menguji sterilitas kit-kering siprofloksasin adalah menggunakan prosedur inokulasi langsung ke dalam media uji (Farmakope Indonesia, 1995). Media uji yang digunakan adalah medium padat Nutrient Agar dan medium cair Tioglikolat. Jumlah kit-kering siprofloksasin yang diuji adalah satu buah dengan medium padat dan cair yang digunakan masing-masing dua buah (duplo). Pada medium padat Nutrient Agar ditandai 3 titik pengujian agar apabila terjadi kontaminasi dapat diketahui kontaminasi tersebut berasal dari kit-kering siprofloksasin yang diuji, bukan berasal dari kontaminasi lain. Medium yang telah berisi larutan dari kit-kering siprofloksasin diinkubasi pada suhu 37° C di dalam inkubator selama 7 hari. Pengamatan dilakukan dalam setiap hari. Setelah hari ketujuh, pada medium padat Nutrient Agar dan medium cair Tioglikolat tidak terlihat adanya pertumbuhan mikroba sehingga dapat dinyatakan kit-kering siprofloksasin yang dibuat bersifat steril.

4.3 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* wild-type

Berdasarkan pewarnaan gram, *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, dengan warna ungu biru, berbentuk kokus dan terkadang ada yang koloninya bergerombol seperti anggur, sedangkan untuk *Escherichia coli* termasuk bakteri Gram negatif, dengan warna ungu merah, berbentuk batang pendek agak bulat (seperti kokobasil). Bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan zat warna kristal violet sehingga berwarna merah sedangkan bakteri Gram positif yang dapat mempertahankan zat warna kristal violet akan berwarna ungu. Perbedaan ini dikarenakan oleh struktur dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang berbeda. Pada bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* terdapat membran plasma tunggal yang dikelilingi peptidoglikan yang menyusun hampir 90% dari dinding sel bakteri tersebut (Cooper dan Hausman, 2007). Disisi lain, pada bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli* memiliki dinding sel yang terdiri dari lapisan murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida. Lapisan murein-lipoprotein membentuk 20% dari total dinding sel dan lapisan fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida membentuk 80% dari dinding sel (Karsinah, 1994).

4.4 Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) Antibiotik Kotrimoksazol terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* wild-type

KHM antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* wild-type sebesar 37,50 ppm.

Penentuan KHM antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* wild-type menggunakan metode pengenceran obat dalam tabung dengan 13 konsentrasi berbeda. Prosedur ini dilakukan secara triplo. Kadar hambat minimum antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan dari konsentrasi obat terkecil yang menghasilkan kejernihan yang pertama yaitu pada konsentrasi 37,50 ppm. Pada konsentrasi 37,50 ppm, dua dari tiga buah tabung reaksi yang digunakan menunjukkan hasil yang jernih sehingga dapat dikatakan bahwa KHM antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* wild-type sebesar 37,50 ppm. Hasil pengamatan KHM antibiotik kotrimoksazol

terhadap bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* dapat dilihat dalam Tabel 4.1 dan Gambar 4.1.

4.5 Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) Antibiotik Kotrimoksazol terhadap Bakteri *Escherichia coli wild-type*

Kadar hambat minimum antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Escherichia coli wild-type* sebesar 37,50 ppm.

Penentuan KHM antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Escherichia coli wild-type* menggunakan metode pengenceran obat dalam tabung dengan 13 konsentrasi berbeda. Prosedur ini dilakukan secara triplo. KHM antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan dari konsentrasi obat terkecil yang menghasilkan kejernihan yang pertama yaitu pada konsentrasi 37,50 ppm. Pada konsentrasi 37,50 ppm, ketiga buah tabung reaksi yang digunakan menunjukkan hasil yang jernih sehingga dapat dikatakan bahwa KHM antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Escherichia coli wild-type* sebesar 37,50 ppm. Hasil pengamatan KHM antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Escherichia coli wild-type* dapat dilihat dalam Tabel 4.2 dan Gambar 4.2.

4.6 Pengujian Kepekaan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus wild-type* terhadap Antibiotik Kotrimoksazol

Bakteri *Escherichia coli wild-type* yang telah diberikan antibiotik sebesar 18,75 ppm selama lima hari berturut-turut menghasilkan bakteri *Escherichia coli wild-type* yang resisten dan bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* yang telah diberikan antibiotik sebesar 9,38 ppm selama empat hari berturut-turut menghasilkan bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* yang resisten.

Bakteri *Escherichia coli wild-type* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang resisten didefinisikan sebagai bakteri yang masih dapat bertahan hidup ketika diberikan antibiotik dengan konsentrasi kadar hambat minimumnya. Bakteri dibuat resisten terhadap antibiotik kotrimoksazol dengan melakukan pemberian antibiotik kotrimoksazol dibawah KHM selama lima hari berturut-turut untuk *Escherichia coli wild-type* dan empat hari berturut-turut untuk *Staphylococcus aureus wild-type*. Bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* dan *Escherichia coli*

wild-type yang telah diberikan antibiotik kotrimoksazol dibawah KHM selama empat hingga lima hari berturut-turut diuji kepekaannya terhadap antibiotik kotrimoksazol sebesar KHM yaitu 37,50 ppm menggunakan medium padat Mueller-Hinton Agar dengan metode sumuran. Pada prosedur ini digunakan dua buah cawan petri berisi medium Mueller Hinton Agar yang telah dibuat empat sumuran untuk masing-masing konsentrasi antibiotik yang diberikan selama lima hari berturut-turut untuk *Escherichia coli wild-type* dan empat hari berturut-turut untuk *Staphylococcus aureus wild-type*. Bakteri yang tidak menghasilkan zona inhibisi atau menghasilkan zona inhibisi lebih kecil dari kontrol bakteri dapat dinyatakan telah resisten.

Bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* yang resisten didapat dengan pemberian antibiotik kotrimoksazol sebesar 9,38 ppm selama empat hari berturut-turut yang dibuktikan dengan tidak dihasilkan zona inhibisi setelah diberikan antibiotik sebesar KHM yaitu 37,50 ppm dan bakteri *Escherichia coli wild-type* yang telah diberikan antibiotik sebesar 18,75 ppm selama lima hari berturut-turut ternyata menghasilkan bakteri *Escherichia coli wild-type* yang resisten karena menghasilkan zona inhibisi yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol bakteri setelah diberikan antibiotik sebesar KHM yaitu 37,50 ppm. Diameter zona inhibisi yang terbentuk oleh bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* dapat dilihat dalam Tabel 4.3 dan Gambar 4.3. Diameter zona inhibisi yang terbentuk oleh bakteri *Escherichia coli wild-type* dapat dilihat dalam Tabel 4.4 dan Gambar 4.4.

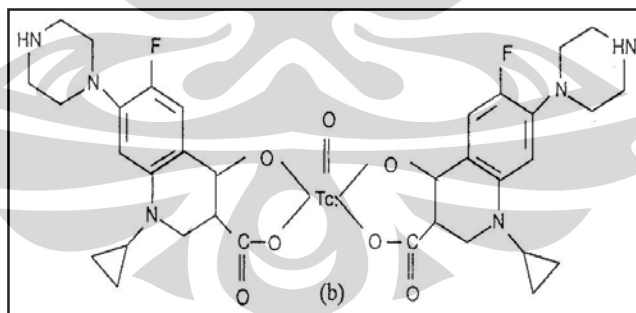
Setelah didapatkan bakteri *Escherichia coli wild-type* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang resisten, bakteri yang resisten tersebut masing-masing ditanam ke dalam medium Nutrient Agar yang telah dibuat berisi antibiotik sebesar KHM yaitu 37,50 ppm dengan tujuan agar bakteri *Escherichia coli wild-type* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang dapat tumbuh dalam medium Nutrient Agar tersebut hanya bakteri *Escherichia coli wild-type* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang telah resisten terhadap antibiotik kotrimoksazol dengan konsentrasi 37,50 ppm. Bakteri yang telah resisten tersebut diremajakan setiap 24 jam sebelum digunakan untuk proses *uptake* terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.

4.7 Penandaan Kit-Kering Sipprofloksasin dengan Radionuklida ^{99m}Tc

Dari proses penandaan kit-kering sipprofloksasin dengan radionuklida ^{99m}Tc , didapat radiofarmaka ^{99m}Tc -sipprofloksasin dengan pH = 5,5 dan aktivitas sebesar 2–8 mCi/1,5 ml.

Preparasi radiofarmaka ^{99m}Tc -sipprofloksasin dilakukan dengan penambahan radionuklida ^{99m}Tc sesaat sebelum digunakan. Untuk proses *uptake*, kit-kering sipprofloksasin dipreparasi dengan penambahan 1,5 ml larutan $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ dengan aktivitas 2-13 mCi. Aktivitas yang diberikan untuk proses *uptake* disesuaikan dengan aktivitas yang diijinkan dalam skala laboratorium. Selanjutnya sediaan diinkubasi dalam suhu kamar selama 15 menit. Waktu inkubasi pada suhu kamar selama 15 menit dengan pH = 3 dan volume akhir radiofarmaka sebesar 1,5 ml merupakan kondisi yang optimum dalam penandaan sipprofloksasin dengan radionuklida ^{99m}Tc (Zainuddin, Hidayat, dan Iljas, 2009).

Sn^{2+} pada $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ berfungsi sebagai reduktor yang menurunkan bilangan oksidasi ^{99m}Tc yaitu +7 menjadi bilangan oksidasi yang rendah, sedangkan asam tartrat digunakan sebagai *ligand exchange* (Sriyani dan Zainuddin, 2009). Asam tartrat akan mengikat ^{99m}Tc , membentuk kompleks ^{99m}Tc -tartrat. Setelah itu molekul tartrat yang telah berikatan dengan atom ^{99m}Tc akan digantikan oleh dua molekul sipprofloksasin membentuk suatu kompleks khelat dengan struktur sebagai berikut:



[sumber: Basry dan Zainuddin, 2005]

Gambar 2.4 Struktur kimia kompleks ^{99m}Tc -sipprofloksasin

4.8 Pengujian Kemurnian Radiokimia ^{99m}Tc -sipprofloksasin

Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -sipprofloksasin yang didapat rata-rata sebesar $87,45 \pm 3,88\%$ (n= 3).

Universitas Indonesia

Kemurnian radiokimia senyawa bertanda ^{99m}Tc -siprofloksasin ditentukan dengan cara Kromatografi Lapis Tipis Instant (*Instant Thin Layer Chromatography*, ITLC). Untuk mendeteksi adanya $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dan $^{99m}\text{TcO}_2$ digunakan 2 fase gerak yang berbeda. Untuk fase gerak Etil Metil Keton, fase diam yang digunakan kertas kromatografi Whatman 1 (1x10 cm). Sedangkan fase gerak lainnya digunakan larutan yang merupakan campuran dari etanol, aquabidest, dan ammonia dengan perbandingan 2 : 5 : 1 (disebut fase gerak C1). Dengan fase gerak C1, fase diam yang digunakan adalah kertas kromatografi ITLC-SG (1x10 cm).

Dengan fase gerak C1 (etanol, aquabidest, dan ammonia dengan perbandingan 2: 5: 1), perteknetat bebas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dan ^{99m}Tc -siprofloksasin akan bermigrasi ke batas akhir yaitu pada cacahan No.8 ($R_f = 0,8-1,0$). Sedangkan ^{99m}Tc tereduksi ($^{99m}\text{TcO}_2$) akan tetap tinggal di batas awal ($R_f = 0$). Sistem ini dapat menentukan jumlah ^{99m}Tc tereduksi ($^{99m}\text{TcO}_2$). Persentase pengotor $^{99m}\text{TcO}_2$ dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Pengotor radiokimia } (^{99m}\text{TcO}_2)(\%) = \frac{\text{cacahan pada } R_f = 0 (^{99m}\text{TcO}_2)}{\text{Jumlah cacahan pada kromatogram}} \times 100\% \quad (4.1)$$

Dari 3 kali pengulangan untuk pengujian kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin diperoleh pengotor radiokimia berupa $^{99m}\text{TcO}_2$ sebesar 0,01%; 3,99%; dan 8,78% dengan rata-rata sebesar $4,26 \pm 4,39\%$ ($n= 3$).

Sedangkan dengan fase gerak Etil Metil Keton untuk proses pemisahan, ^{99m}Tc tereduksi ($^{99m}\text{TcO}_2$) dan ^{99m}Tc -siprofloksasin akan tetap tinggal di batas awal ($R_f = 0$), serta perteknetat bebas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) akan bermigrasi ke batas akhir ($R_f = 0,8-1,0$). Sistem ini cocok untuk menentukan jumlah ^{99m}Tc -perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$).

Persentase pengotor radiokimia berupa $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Pengotor radiokimia } (^{99m}\text{TcO}_4^-)(\%) = \frac{\text{Jumlah cacahan pada } R_f = 0,8 - 1,0 (^{99m}\text{TcO}_4^-)}{\text{Jumlah cacahan pada kromatogram}} \times 100\% \quad (4.2)$$

Dari 3 kali pengulangan untuk pengujian kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin diperoleh pengotor radiokimia berupa $^{99m}\text{TcO}_4^-$ sebesar 9,92%; 13,02%; dan 1,94% dengan rata-rata sebesar $8,29 \pm 5,72\%$ ($n=3$).

Setelah persentase kedua pengotor diperoleh, maka dapat dihitung persentase kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin dihitung dengan cara sebagai berikut:

Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin (%) =

$$100\% - (^{99m}\text{TcO}_4^-)(\%) - (^{99m}\text{TcO}_2)(\%) \quad (4.3)$$

Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin yang didapat sebesar 90,07%; 82,99%; 89,28% dengan rata-rata sebesar $87,45 \pm 3,88\%$ ($n=3$).

Data dan hasil pengujian kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin dapat dilihat dalam Tabel 4.5, 4.6, dan 4.7.

4.9 Penentuan Uptake Bakteri *Escherichia coli* wild-type dan *Staphylococcus aureus* wild-type yang Resistan Kotrimoksazol terhadap Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Bakteri *Escherichia coli* wild-type yang resisten kotrimoksazol didapatkan *uptake* sebesar $37,12 \pm 6,54\%$ ($n=6$) dan bakteri *Staphylococcus aureus* wild-type yang resisten kotrimoksazol didapatkan *uptake* ^{99m}Tc -siprofloksasin terhadap sebesar $41,94 \pm 7,17\%$ ($n=6$).

Antibiotik bertanda radioaktif seperti radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin memiliki sifat bakterisid sehingga dapat terakumulasi pada daerah infeksi yang disebabkan oleh bakteri penyebab infeksi seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Sifat inilah yang mendasari proses *uptake* yang dilakukan dalam penelitian ini sehingga dapat diperoleh persentase *uptake* bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* wild-type. Masing-masing bakteri terlebih dahulu dibuat resisten sehingga dapat diketahui persentase *uptake* kedua bakteri yang telah dibuat resisten dengan antibiotik kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin agar diagnosis infeksi yang dihasilkan dengan menggunakan antibiotik bertanda radioaktif tepat. Mengenai mekanisme akumulasi radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin pada bakteri, kemungkinan besar radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin tersebut berikatan dengan bakteri penyebab

infeksi dengan mekanisme yang sama dengan antibiotik siprofloksasin itu sendiri berikatan dengan bakteri (Sonmezoglu et al., 2001). Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin akan terakumulasi pada daerah infeksi yang disebabkan baik oleh bakteri Gram positif maupun Gram negatif.

Pada prosedur *uptake*, bakteri resisten kotrimoksazol yang telah ditambahkan radiofarmaka diinkubasi dalam suhu 37 °C di dalam *shaker incubator* selama 1 jam agar *uptake* yang terjadi merata ke seluruh bakteri. Waktu inkubasi 1 jam merupakan waktu yang optimal dalam proses *uptake* bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* terhadap radiofarmaka (Zainuddin dan Basry, 2009). Selanjutnya bakteri dimatikan dengan cara dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit, 121 °C dengan tujuan untuk menghentikan proses *uptake* yang berlangsung. Selanjutnya disentrifugasi dan dipisahkan antara fraksi endapan dan filtrat. Fraksi endapan yang terbentuk merupakan bakteri yang terikat dengan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dan fraksi filtrat merupakan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin bebas yang tidak terikat dengan bakteri (Alexander et al., 2005). Masing-masing fraksi endapan dan filtrat dicacah untuk menentukan persentase *uptake* dari bakteri. Setelah didapat data cacaha, persentase *uptake* dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

Persentase *uptake* bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin =

$$\frac{\text{cacahan endapan}}{\text{cacahan endapan} + \text{cacahan filtrat}} \times 100\% \quad (4.4)$$

Dari 6 kali pengulangan, bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* resisten kotrimoksazol didapatkan *uptake* sebesar 36,70%; 38,81%; 32,19%; 48,11% 45,15%; dan 50,66% dengan rata-rata sebesar $41,94 \pm 7,17\%$ (n= 6). Data cacahan dan persentase hasil *uptake* bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan 4.9. Sedangkan untuk bakteri *Escherichia coli wild-type* resisten kotrimoksazol dari 6 kali pengulangan didapatkan *uptake* sebesar 42,80%; 43,75%; 42,33%; 33,36%; 29,27%; dan 31,20% dengan rata-rata sebesar $37,12 \pm 6,54\%$ (n= 6). Data cacahan dan persentase hasil *uptake* bakteri *Escherichia coli*

wild-type resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dapat dilihat pada Tabel 4.10 dan 4.11.

Pada proses *uptake* ini, digunakan kontrol larutan $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$ untuk melihat apakah bakteri resisten tersebut juga melakukan *uptake* terhadap $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yang merupakan pengotor radiokimia. Dari hasil yang didapat, baik bakteri *Escherichia coli* maupun *Staphylococcus aureus* yang sudah dibuat resisten dengan antibiotik kotrimoksazol juga melakukan *uptake* terhadap $^{99m}\text{TcO}_4^-$ namun hanya dalam jumlah yang relatif kecil yaitu sekitar 0,70% hingga 2,47%.

Selain itu, dilihat pula *uptake* bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang tidak dibuat resisten (non-resisten) kotrimoksazol untuk membandingkan besarnya *uptake* antara bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang dibuat resisten kotrimoksazol dengan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang tidak dibuat resisten kotrimoksazol. Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang dibuat resisten kotrimoksazol menangkap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dengan persentase yang lebih tinggi dibanding bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus wild-type* yang tidak dibuat resisten kotrimoksazol.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin yang disintesis bersifat steril, memiliki pH 5,5 dan aktivitas sebesar 2-8 mCi/1,5 ml, serta kemurnian radiokimia sebesar $87,45 \pm 3,88\%$ (n= 3).
2. Bakteri *Escherichia coli wild-type* dan *Staphylococcus aureus wild-type* resisten kotrimoksazol yang diuji memiliki *uptake* terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin berturut-turut sebesar $37,12 \pm 6,54\%$ (n= 6) dan $41,94 \pm 7,17\%$ (n= 6).

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai *uptake* bakteri penyebab infeksi lainnya yang telah resisten terhadap antibiotik-antibiotik lain yang umum digunakan sebagai terapi infeksi agar dapat dihasilkan diagnosis infeksi yang tepat.
2. Perlu dikembangkan antibiotik lain sebagai senyawa bertanda radioaktif untuk tujuan diagnosis akibat meningkatnya masalah resistensi bakteri terhadap antibiotik.

DAFTAR ACUAN

- Alexander, K., Drost, W.T., Mattoon, J.S., Kowalski, J.J., Funk, J.A. dan Crabtree, A.C. (2005). Binding of Ciprofloxacin Labelled with Technetium Tc 99m versus ^{99m}Tc -pertechnetate to a Live and Killed Equine Isolate of *Escherichia coli*. *Can. J. Vet. Res.*, 69 (4), 272–277.
- Andersson, D. I. (2005). The Ways in Which Bacteria Resist Antibiotics. *Intern. J. of Risk & Safety in Med.*, 17, 111–116.
- Anonim. (2001). *The Merck Index*. (13th ed.). New York: Merck & Co., Inc.
- British Pharmacopoeia*. (CD-ROM). (2007). London: The Stationary Office.
- Bari, S.B., Mahajan, B.M., Surana, S.J. (2008). Resistance to Antibiotic: A Challenge in Chemotherapy. *Indian J. of Pharm. Education and Research*, 42 (1), 3-11.
- Basry H.T. dan Zainuddin, N. (2005). Formulasi Radiofarmaka ^{99m}Tc -Siprofloksasin untuk Diagnosis Infeksi. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir*. Bandung: Puslitbang Teknik Nuklir-BATAN, 38-45.
- Bisht, R., Katiyar, A., Singh R., Mittal, P. (2009). Antibiotic Resistance –A Global Issue of Concern. *Asian J. of Pharm. and Clin. Research* , 2 (2), 34-39.
- Britton, K.E., et al. (2002). Imaging Bacterial Infection with ^{99m}Tc -ciprofloxacin. *J. Clin. of Pathol.*, 55, 817-823.
- Britton, K.E, Vinjamuri, S., Hall, A.V., Solanki, K., Siraj, Q.H., Bomanji, J., Das, S.S. (1997). Clinical Evaluation of Technetium-99m Infecton for the Localization of Bacterial Infection. *Eur. J Nucl. Med.*, 24, 553-556.
- Cooper, G.M., dan Hausman, R.E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach* (4th ed.). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

- Das, S.S. dan Britton, K.E. (2003). Bacterial Infection Imaging. *World J. of Nucl. Med.*, 2 (3), 173-179.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia* (IV ed.). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1054.
- Eckelman, W.C. dan Coursey, B.M. (1982). Technetium-99m: Generators, Chemistry, and Preparation of Radiopharmaceuticals. *Int. J. Appl. Isot.*, 33, 793-890.
- Gano, L., Patricio, L., Cantiho, G., Pena, H., Martins, T., Marques, E. (1998). Ciprofloxacin in Imaging of Infective Versus Sterile Inflammation. *Modern Trends in Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy*. Lisbon: IAEA-TECDOC, 213-220.
- Gnanasegaran, G., Croasdale, J., Buscombe, J.R. (2004). Nuclear Medicine in Imaging Infection and Inflammation: Part-I. Radiopharmaceuticals. *World J. of Nucl. Med.*, 3, 156.
- Hall, A. K., Solanki, K., Vinjamuri, S., Britton, K.E, Das, S.S. (1998). Evaluation of the Efficacy of ^{99m}Tc-Infecton, A Novel Agent for Detecting Sites of Infection. *J. Clin. of Pathol.*, 51, 215.
- Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Colodner R. (2005). Spontaneous Conversion to Quinolone and Fluoroquinolone Resistance among Wild-Type *Escherichia coli* Isolates in Relation to Phylogenetic Background and Virulence Genotype. *Antimicrob. Agents and Chemother.* , 49 (11), 4739–4744.
- Kaiser, G. E. (1999). *Biol 230 Microbiology Lab Manual*. Dipetik Januari 21, 2010, dari <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/copwrt.html>.
- Karsinah, L. H. (1994).. Batang Negatif Gram, dalam: *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran* (Revisi ed.). Jakarta: Binarupa Aksara, 162-165.
- Kristanti, A. N. (Penyunt.). (2008). *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press, 156.

- Kumala, P. dan Nuswantari D. (1998). *Kamus Kedokteran Dorland*. Jakarta: EGC, 940.
- Leswara, Nelly D. (2005). *Buku Ajar Radiofarmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, 32.
- Mahmood, A. dan Jones, A. G. (2003). *Handbook of Radiopharmaceuticals*. (C. S. Michael J. Welch, Penyunt.) England: John Willey & Sons, Ltd.
- Mariana, Y dan Setiabudy, R.. (1995). Sulfonamid, Kotrimoksazol dan Antiseptik Saluran Kemih. dalam: *Farmakologi dan Terapi*. (Ed. ke-4). Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 590-593.
- Neuman, K. dan Koln, P. (1962). Freeze Drying. A Modern Application of Refrigeration. *Rep. Science Technol.*, 45-53.
- Pratiwi, S.T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga Medical Series, 165-174.
- Puslitbang Teknik Nuklir-BATAN. (2009). *Coaching Radioisotop dalam Farmasi dan Kedokteran*. Bandung: Puslitbang Teknik Nuklir-BATAN.
- Radji, M. (2004). *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Richards, P. (1966). Nuclide Generators in: Radioactive Pharmaceuticals. *USAEC Symposium Series*. Tennessee: CONF-651111, 6, 155-163.
- Saha, G.B. (2003). *Fundamental of Nuclear Pharmacy* (5th ed.). New York: Springer-Verlag Inc., 31-34.
- Setiabudy, R. (1995). Antimikroba Lain dalam: *Farmakologi dan Terapi* (Ed. Ke-4). Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 682-685.
- Sierra J.M., Rodriguez-Puig D., Soriano A., Mensa J., Piera C., dan Vila J. (2008). Accumulation of ^{99m}Tc-ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 52 (7), 2691–2692.

- Sonmezoglu, K., et al. (2001). Usefulness of ^{99m}Tc -ciprofloxacin (Infecton) Scan in Diagnosis of Chronic Orthopedic Infections: Comparative Study with ^{99m}Tc -HMPAO Leukocyte Scintigraphy. *J. of Nucl. Med.*, 42, 567–574.
- Sriyani, M.E. dan Zainuddin, N. (2009). Karakteristik Penyimpanan Kit Cair Radiofarmaka Siprofloksasin dalam Wadah Tunggal. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir*. Bandung: Puslitbang Teknik Nuklir-BATAN.
- Sudarmono, P. (1994). Genetika dan Resistensi, dalam: *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran* (Revisi ed.). Jakarta: Binarupa Aksara, 33-38.
- Sumpena, Y. Sugiharti, R.J., & Zainuddin, N. (2007). Biodistribusi dan Uji Clearance ^{99m}Tc -siprofloksasin pada Mencit (*Mus Muculus*) yang Terinfeksi bakteri *Escherichia coli*. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir*. Bandung: Puslitbang Teknik Nuklir-BATAN.
- Tubis, M dan Wolf, W. (1976). *Radiopharmacy*. New York: John Willey & Sons, Inc.
- Warsa, U.C. (1994). *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran* (Revisi ed.). Jakarta: Binarupa Aksara, 103-111.
- Zainuddin, N. dan Basry, H.T. (2009). Pengembangan dan Aplikasi Klinis Kit-Kering Siprofloksasin. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia*. Bandung: Puslitbang Teknik Nuklir-BATAN, 38-45.
- Zainuddin, N., Basry H.T., Iljas, R., dan Suminar M.R. (2009). Karakterisasi Radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin sebagai Penyidik Infeksi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 16 (4), 214-221.
- Zhang Hong, Jiang Ning-yi dan Zhu Lin. (2009). Experimental Studies on Imaging of Infected Site with ^{99m}Tc -Labeled Ciprofloxacin in Mice. *Chin. Med. J.*, 122 (16), 1907-1909.
- Zolle, I. (Penyunt.). (2007). *Technetium-99m Pharmaceuticals, Preparations and Quality Control in Nuclear Medicine*. New York: Springer Berlin Heidelberg.





Gambar 3.1 Generator $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ buatan BATAN TEKNOLOGI



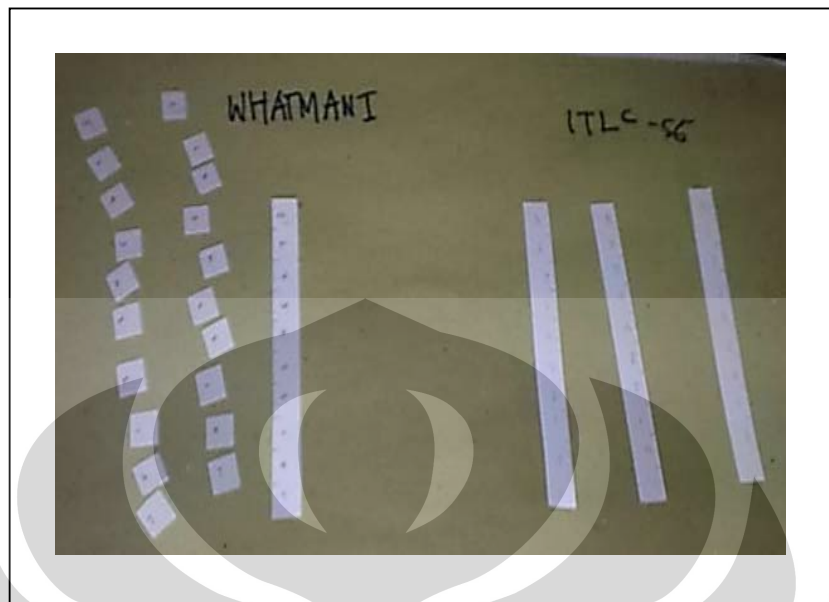
Gambar 3.2 Pencacah Saluran Tunggal (*Single Channel Analyzer*) dengan detektor NaI (Tl) (Ortec)



Gambar 3.3 Alat *Dose Calibrator* (Victoreen)



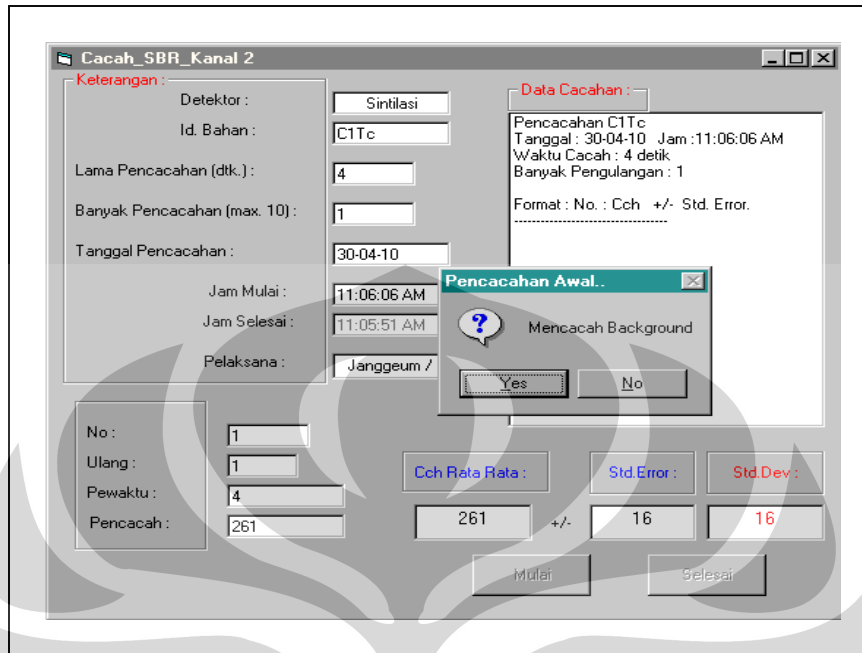
Gambar 3.4 Kontainer timbal



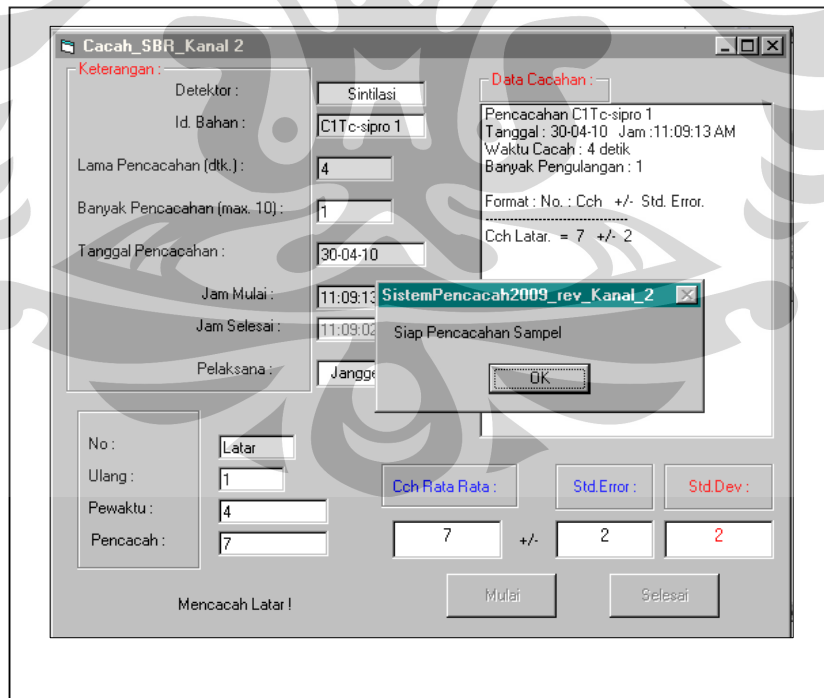
Gambar 3.5 Kertas Whatman 1 (Kiri) dan ITLC-SG (kanan) untuk proses pencacahan



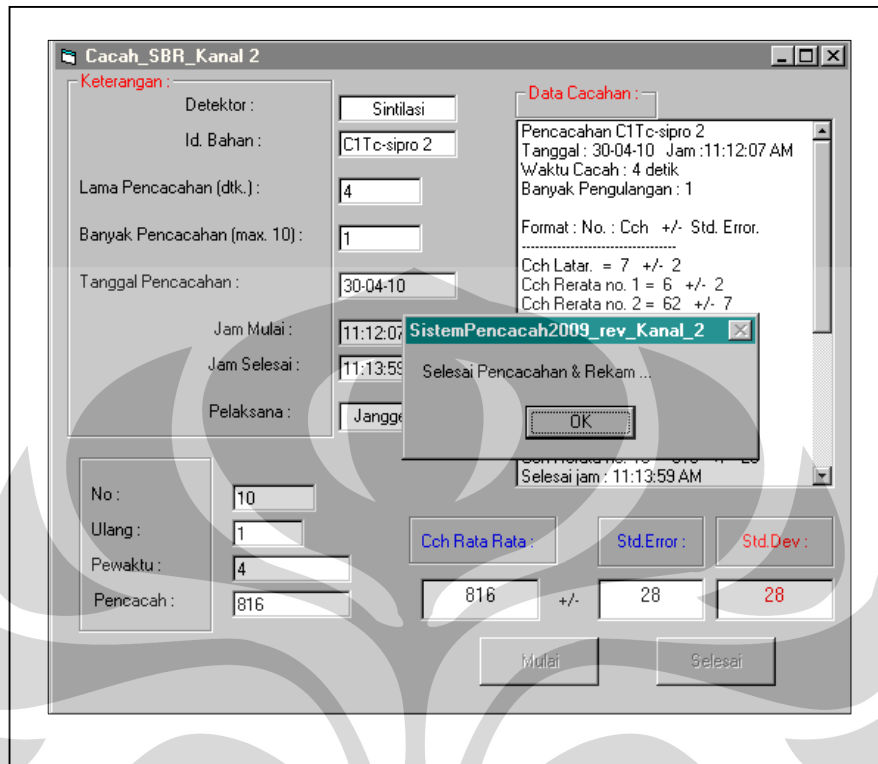
Gambar 3.6 Aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (*Single Channel Analyzer*)



Gambar 3.7 Pencacahan *Background* (latar belakang) dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (*Single Channel Analyzer*)



Gambar 3.8 Pencacahan sampel dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (*Single Channel Analyzer*)



Gambar 3.9 Penyelesaian dan penyimpanan hasil pencacahan dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (*Single Channel Analyzer*)

```

30041059 - Notepad
File Edit Format View Help
-----
Jenis Detektor : Sintilasi
Identifikasi : MEK Tc-sipro1
Banyak Sampel : 10
Waktu Cacah : 4 detik
Banyak Pengulangan : 1
Tanggal Pencacahan : 30-04-10
Jam Mulai : 10:59:51 AM
Jam Selesai : 11:02:31 AM
Nama file : 30041059.sbr
Pelaksana : Jangeum / udin

Format : Nomor : Cacahan +/- Std.Error : (Std.Dev)
-----
Cacah Latar = 3 +/- 1
Cacah Rerata Nomor 1 = 9 +/- 3 :( 3 )
Cacah Rerata Nomor 2 = 1626 +/- 40 :( 40 )
Cacah Rerata Nomor 3 = 56 +/- 7 :( 7 )
Cacah Rerata Nomor 4 = 47 +/- 6 :( 6 )
Cacah Rerata Nomor 5 = 56 +/- 7 :( 7 )
Cacah Rerata Nomor 6 = 44 +/- 6 :( 6 )
Cacah Rerata Nomor 7 = 41 +/- 6 :( 6 )
Cacah Rerata Nomor 8 = 46 +/- 6 :( 6 )
Cacah Rerata Nomor 9 = 68 +/- 8 :( 8 )
Cacah Rerata Nomor 10 = 230 +/- 15 :( 15 )

Pengolahan dengan pengurangan latar
-----
No. 1 = 6
No. 2 = 1623
No. 3 = 53
No. 4 = 44
No. 5 = 53
No. 6 = 41
No. 7 = 38
No. 8 = 43
No. 9 = 65
No. 10 = 227
Selesai

```

Gambar 3.10 Tampilan hasil pencacahan dengan aplikasi Sistem Pencacah untuk SCA (*Single Channel Analyzer*)



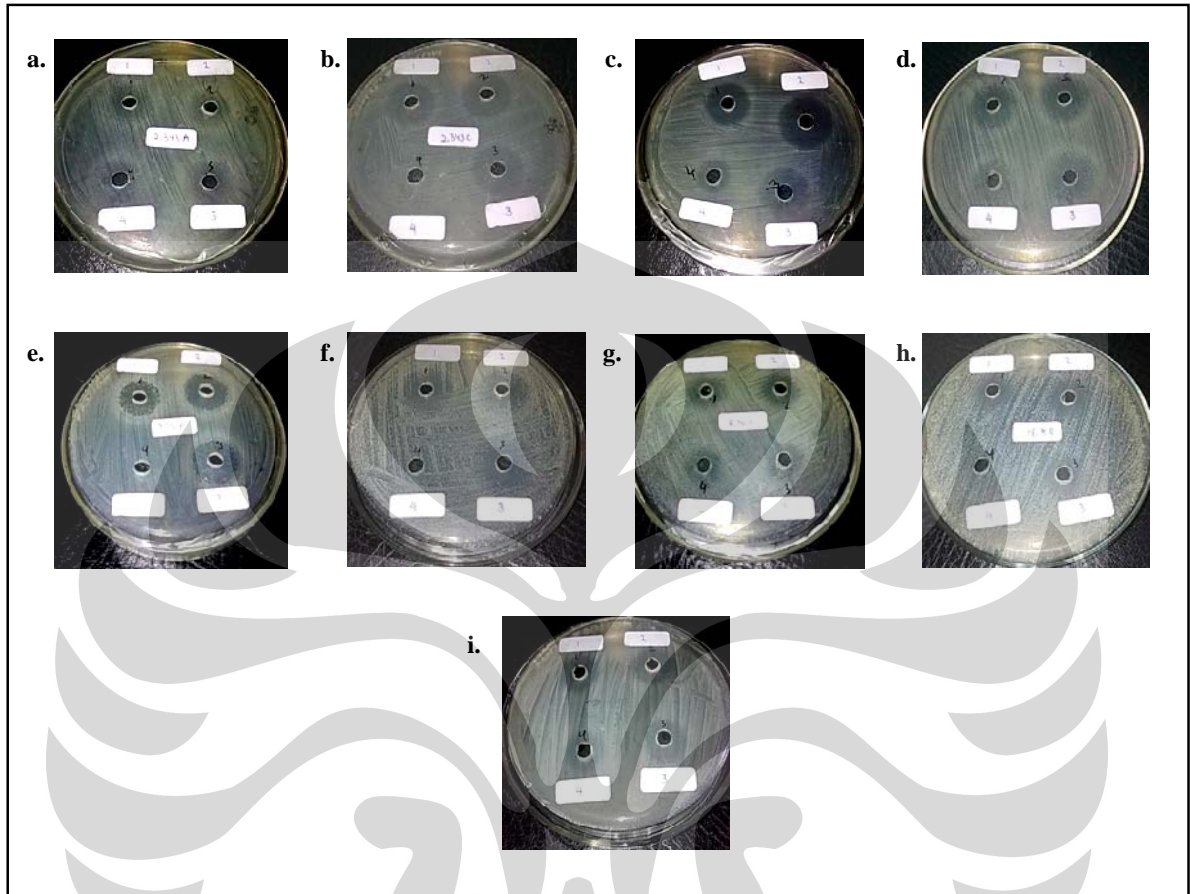
Keterangan : Konsentrasi dari kiri ke kanan berturut-turut
2,34 ppm; 4,69 ppm; 9,38 ppm; 18,75 ppm; 37,50 ppm

Gambar 4.1 Hasil kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap *Staphylococcus aureus* wild-type



Keterangan : Konsentrasi dari kiri ke kanan berturut-turut
9,38 ppm; 18,75 ppm; 37,50 ppm; 75 ppm; 150 ppm

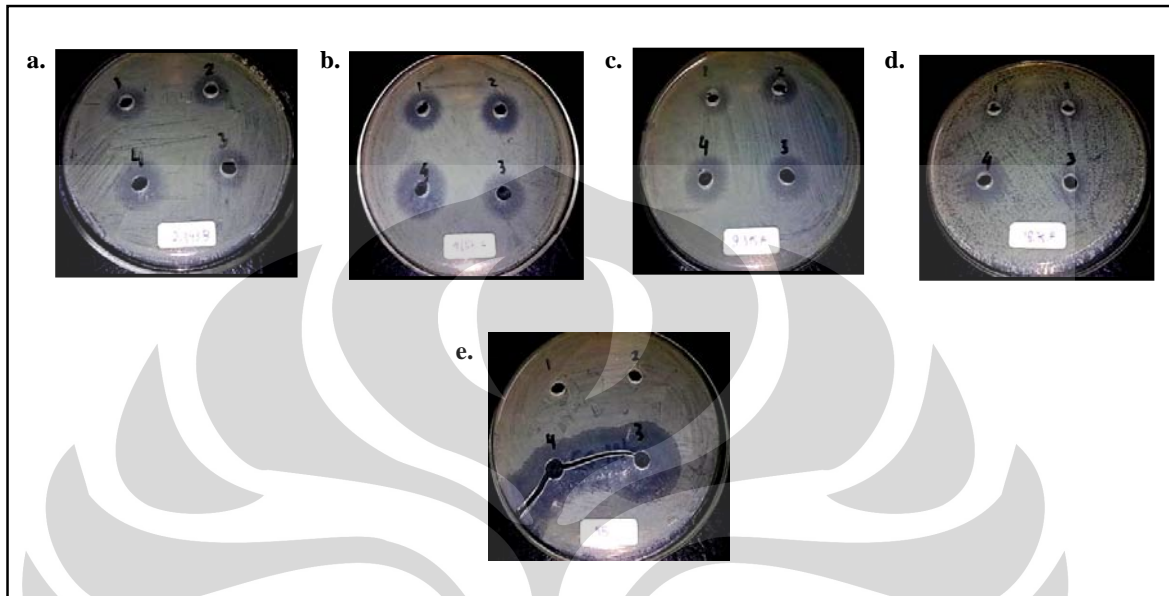
Gambar 4.2 Hasil kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap *Escherichia coli* wild-type



Keterangan:

- Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi pemberian antibiotik selama 4 hari berturut-turut untuk a dan b. 2,34 ppm; c dan d. 4,69 ppm; e dan f. 9,38 ppm; g dan h. 18,75 ppm; i. Kontrol Bakteri
- Konsentrasi sumuran 1, 2, dan 3 sebesar 75 ppm dan konsentrasi sumuran 4 sebesar 37,50 ppm.

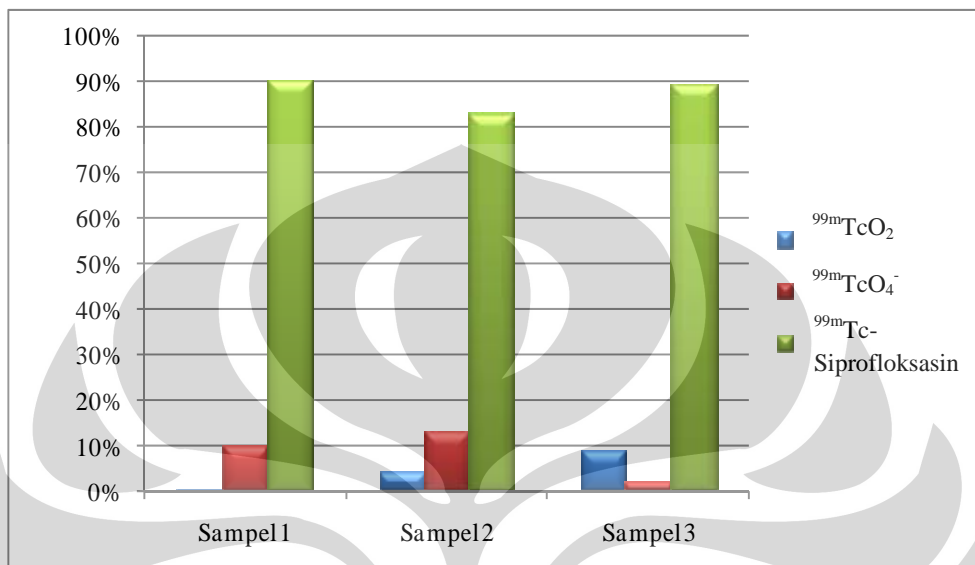
Gambar 4.3 Hasil pengujian kepekaan bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* terhadap antibiotik kotrimoksazol konsentrasi 37,50 ppm



Keterangan:

- Bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi pemberian antibiotik selama 5 hari berturut-turut untuk a. 2,34 ppm; b. 4,69 ppm; c. 9,38 ppm; d. 18,75 ppm; e. Kontrol Bakteri
- Konsentrasi sumuran 1, 2, dan 3 sebesar 37,50 ppm dan konsentrasi sumuran 4 sebesar 75 ppm sebagai pembanding.

Gambar 4.4 Hasil pengujian kepekaan bakteri *Escherichia coli wild-type* terhadap antibiotik kotrimoksazol 37,50 ppm



Gambar 4.5 Diagram batang hasil uji kemurnian radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin



Tabel 4.1 Hasil pengamatan uji kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Staphylococcus aureus wild-type*

No.	Konsentrasi (ppm)	Tabung I	Tabung II	Tabung III
1	9600	-	-	-
2	4800	-	-	-
3	2400	-	-	-
4	1200	-	-	-
5	600	-	-	-
6	300	-	-	-
7	150	-	-	-
8	75	-	-	-
9	37,50	-	-	+
10	18,75	+	+	+
11	9,38	+	-	+
12	4,69	-	+	+
13	2,34	+	+	+

Keterangan :

Tanda + menunjukkan bakteri hidup (hasil keruh)

Tanda – menunjukkan bakteri tidak hidup (hasil jernih)

Tabel 4.2 Hasil pengamatan uji kadar hambat minimum (KHM) antibiotik kotrimoksazol terhadap bakteri *Escherichia coli wild-type*

No.	Konsentrasi (ppm)	Tabung I	Tabung II	Tabung III
1	9600	-	-	-
2	4800	-	-	-
3	2400	-	-	-
4	1200	-	-	-
5	600	-	-	-
6	300	-	-	-
7	150	-	-	-
8	75	-	-	-
9	37,50	-	-	-
10	18,75	+	+	+
11	9,38	+	+	+
12	4,69	+	+	+
13	2,34	+	+	+

Keterangan :

Tanda + menunjukkan bakteri hidup (hasil keruh)

Tanda – menunjukkan bakteri tidak hidup (hasil jernih)

Tabel 4.3 Diameter zona inhibisi bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* yang diberikan antibiotik kotrimoksazol selama empat hari berturut-turut

Konsentrasi antibiotik kotrimoksazol (ppm)	Diameter (cm)		Rata-rata (cm)
	1	2	
37,50	1,33	2,31	1,82
18,75	0,91	1,31	1,11
9,38*	0,60	0,60	0,60
4,69	1,10	1,56	1,33
2,34	1,42	0,60	1,01

Keterangan :

Diameter sumuran = 0,60 cm

Konsentrasi antibiotik yang dimasukkan ke dalam sumuran = 37,50 ppm

* = bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* yang dianggap telah resisten antibiotik kotrimoksazol

Tabel 4.4 Diameter zona inhibisi bakteri *Escherichia coli wild-type* yang diberikan antibiotik kotrimoksazol selama lima hari berturut-turut

Konsentrasi antibiotik kotrimoksazol yang diberikan selama 5 hari (ppm)	Diameter (cm)			Rata-rata (cm)
	1	2	3	
18,75*	0,99	1,04	1,10	1,04
9,38	1,11	1,33	1,41	1,28
4,69	1,44	1,41	1,37	1,41
2,34	1,37	1,27	1,26	1,30
Kontrol bakteri	0,60	0,60	3,00	1,40

Keterangan :

Diameter sumuran = 0,60 cm

Konsentrasi antibiotik yang dimasukkan ke dalam sumuran = 37,50 ppm

* = bakteri *Escherichia coli wild-type* yang dianggap telah resisten antibiotik kotrimoksazol

Tabel 4.5 Data cacahan uji kemurnian radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dengan fase diam ITLC-SG dan fase gerak larutan etanol: H_2O : ammonia (2:5:1)

No.	Cacahan (cps)		
	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3
-1	5	5	0
0	7	92	2147
1	0	12	261
2	6	11	336
3	6	23	389
4	2	29	486
5	2	25	674
6	28	49	1001
7	62	121	1874
8	53699	1938	15147
Peak 1 ($^{99m}\text{TcO}_2$)	7	92	2147
Peak 2 ($^{99m}\text{TcO}_4$)	53699	1938	22315
Total	53761	2305	24462
TcO_2	0,0001	0,0399	0,0878
TcO_2 (%)	0,01%	3,99%	8,78%

Keterangan :

Aktivitas penandaan $^{99m}\text{TcO}_4^- = 2-13 \text{ mCi}/1,5 \text{ ml}$

Waktu pencacahan = 4 detik

Tabel 4.6 Data cacahan uji kemurnian radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dengan fase diam Whatman 1 dan fase gerak Etil Metil Keton

No.	Cacahan (cps)		
	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3
-1	-1	5	-3
0	15485	2974	21053
1	239	72	189
2	248	82	179
3	252	72	154
4	242	72	124
5	255	97	149
6	309	114	122
7	411	241	166
8	1921	558	439
Peak 1 ($^{99m}\text{TcO}_2$)	15485	2974	21053
Peak 2 ($^{99m}\text{TcO}_4$)	1921	558	439
Total	19361	4287	22572
$^{99m}\text{TcO}_4$	0,0992	0,1302	0,0194
$^{99m}\text{TcO}_4$ (%)	9,92%	13,02%	1,94%

Keterangan :

Aktivitas penandaan $^{99m}\text{TcO}_4^- = 2\text{-}13 \text{ mCi}/1,5 \text{ ml}$

Waktu pencacahan = 4 detik

Tabel 4.7 Hasil uji kemurnian radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Sampel	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4$	^{99m}Tc -siprofloksasin
Sampel 1	0,01%	9,92%	90,07%
Sampel 2	3,99%	13,02%	82,99%
Sampel 3	8,78%	1,94%	89,28%
Rata-rata	4,26 ± 4,39% (n= 3)	8,29 ± 5,72% (n= 3)	87,45 ± 3,88% (n= 3)

Tabel 4.8 Data cacahan *uptake* bakteri *Staphylococcus aureus wild-type* resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Bakteri	No.	^{99m}Tc -siprofloksasin		$^{99m}\text{TcO}_4$	
		(cps)		(cps)	
		Endapan	Filtrat	Endapan	Filtrat
Resisten	1	32675	56367	164	389449
	2	32286	50902	94	417918
	3	33328	70194	88	390481
	4	148689	160367	6790	126075
	5	146343	177772	4710	119140
	6	172878	168371	7639	123381
Non-resisten	1	35447	57422	58	385478
	2	26258	57270	61	397720
	3	32705	68633	96	421324
	4	108123	154220	7190	118841
	5	135771	179128	8164	133481
	6	92147	153917	7238	121767

Keterangan :

Aktivitas penandaan $^{99m}\text{TcO}_4^- = 2-13 \text{ mCi}/1,5 \text{ ml}$

Volume radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin yang dimasukkan = $60 \mu\text{l}$

Waktu pencacahan = 4 detik

Tabel 4.9 Persentase hasil *uptake* bakteri *Staphylococcus aureus* wild-type resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Bakteri	No.	^{99m}Tc -siprofloksasin	$^{99m}\text{TcO}_4$
		(%)	(%)
Resisten	1	36,70%	0,0421%
	2	38,81%	0,0225%
	3	32,19%	0,0225%
	4	48,11%	5,11%
	5	45,15%	3,80%
	6	50,66%	5,83%
	Rata-rata		41,94 ± 7,17% (n= 6)
Non-resisten	1	38,17%	0,0150%
	2	31,44%	0,0153%
	3	32,27%	0,0228%
	4	41,21%	5,70%
	5	43,12%	5,76%
	6	37,45%	5,61%
	Rata-rata		37,28 ± 4,68% (n= 6)

Tabel 4.10 Data cacahan *uptake* bakteri *Escherichia coli wild-type* resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Bakteri	No.	^{99m}Tc -siprofloksasin		$^{99m}\text{TcO}_4$	
		(cps)		(cps)	
		Endapan	Filtrat	Endapan	Filtrat
Resisten	1	113396	151571	640	180545
	2	119954	154217	1986	181434
	3	107002	145802	607	189807
	4	141103	281894	1956	225331
	5	112668	272294	1275	227810
	6	130276	287265	2336	223145
Non-resisten	1	79810	156358	663	177827
	2	93957	176612	616	179436
	3	91940	153112	541	121856
	4	116000	285063	2492	220291
	5	113392	275125	2169	223980
	6	116585	290006	2828	223602

Keterangan :

Aktivitas penandaan $^{99m}\text{TcO}_4^- = 2-13 \text{ mCi}/1,5 \text{ ml}$

Volume radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin yang dimasukkan = $60 \mu\text{l}$

Waktu pencacahan = 4 detik

Tabel 4.11 Persentase hasil *uptake* bakteri *Escherichia coli wild-type* resisten kotrimoksazol terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Bakteri	No.	^{99m}Tc -siprofloksasin	$^{99m}\text{TcO}_4$
		(%)	(%)
Resisten	1	42,80%	0,35%
	2	43,75%	1,08%
	3	42,33%	0,32%
	4	33,36%	0,86%
	5	29,27%	0,56%
	6	31,20%	1,04%
Rata-rata		37,12 ± 6,54% (n= 6)	0,70 ± 0,34% (n= 6)
Non-resisten	1	33,79%	0,37%
	2	34,73%	0,34%
	3	37,52%	0,44%
	4	28,92%	1,12%
	5	29,19%	0,96%
	6	28,67%	1,25%
Rata-rata		32,14 ± 3,73% (n= 6)	0,75 ± 0,41% (n= 6)



LAMPIRAN

Lampiran 1
Komposisi medium

Medium Nutrient Agar

Bacto ekstrak daging	3 gram
Bacto pepton	10 gram
Bacto agar	15 gram
NaCl	5 gram
Air Suling	1 liter

pH 7,3

Perbenihan Cair Tioglikolat

Bacto ekstrak ragi	3 gram
Bacto kasiton	15 gram
Bacton dekstroza	5 gram
NaCl	2,5 gram
l-sistein	0,75 gram
Asam tioglikolat	0,3 ml
Rezazurin	0,001 gram
Air suling	1 liter

pH 7,0

Medium Mueller-Hinton Agar

Sari daging pepton	2 gram
Bacto asam kasamino	17,5 gram
Kanji	1,5 gram
Bacto agar	17 gram
Air suling	1 liter

Lampiran 2

Rumus perhitungan kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin

Dengan fase diam ITLC-SG dan fase gerak larutan etanol: H_2O : ammonia (2:5:1), pengotor $^{99m}\text{TcO}_2$ berada di $R_f = 0$ sedangkan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dan pengotor $^{99m}\text{TcO}_4^-$ berada di $R_f = 0,8-1,0$

Pengotor radiokimia ($^{99m}\text{TcO}_2$)(%) =

$$\frac{\text{Cacahan pada } R_f = 0 (^{99m}\text{TcO}_2)}{\text{Jumlah cacahan pada kromatogram}} \times 100\% \quad (4.1)$$

Dengan fase diam Whatman 1 dan fase gerak Etil Metil Keton, radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dan pengotor $^{99m}\text{TcO}_2$ berada di $R_f = 0$ sedangkan pengotor $^{99m}\text{TcO}_4^-$ berada di $R_f = 0,8-1,0$

Pengotor radiokimia ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)(%) =

$$\frac{\text{Jumlah cacahan pada } R_f = 0,8 - 1,0 (^{99m}\text{TcO}_4^-)}{\text{Jumlah cacahan pada kromatogram}} \times 100\% \quad (4.2)$$

Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -siprofloksasin (%) =

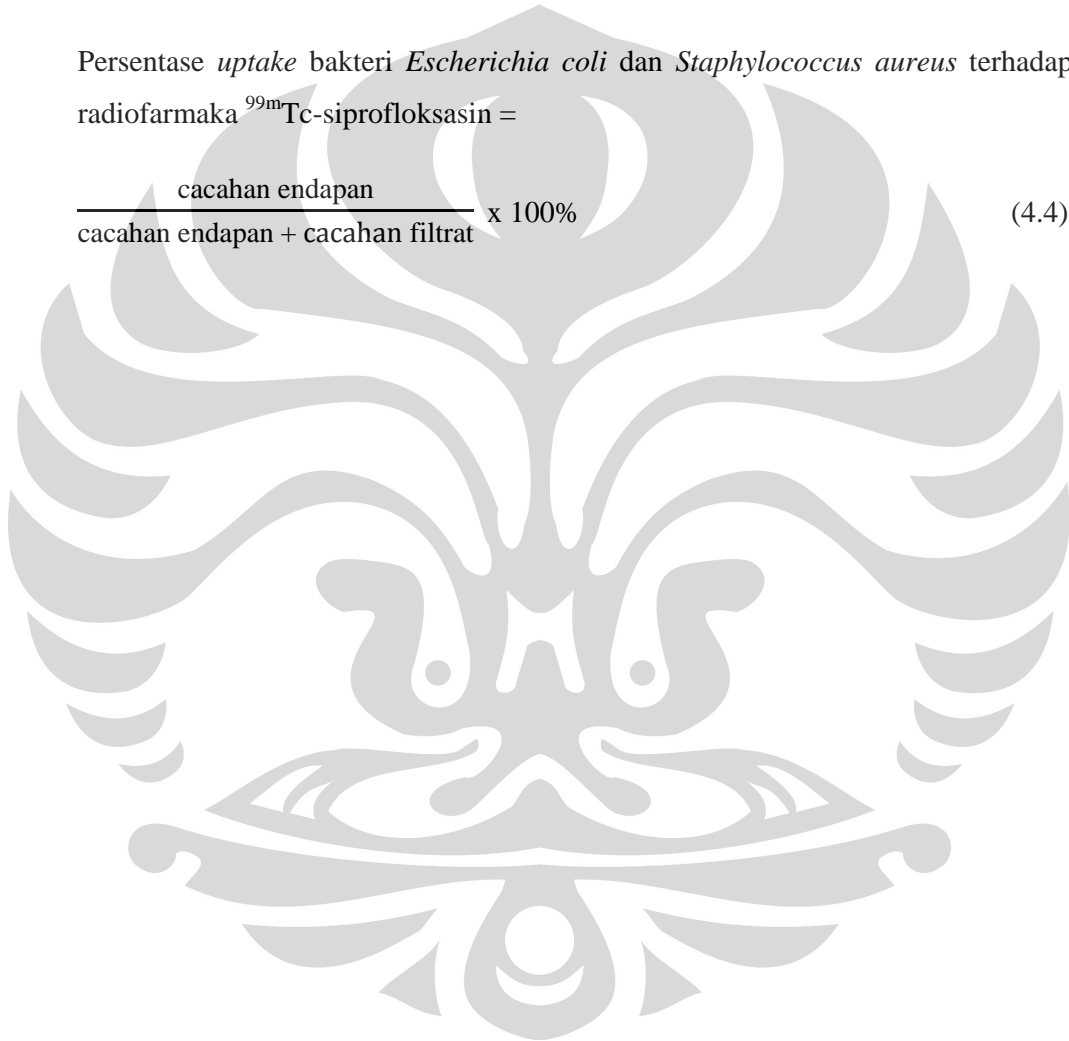
$$100\% - (^{99m}\text{TcO}_4^-)(\%) - (^{99m}\text{TcO}_2)(\%) \quad (4.3)$$

Lampiran 3

Rumus perhitungan *uptake* bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin

Persentase *uptake* bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin =

$$\frac{\text{cacahan endapan}}{\text{cacahan endapan} + \text{cacahan filtrat}} \times 100\% \quad (4.4)$$



Lampiran 4

Sertifikat analisis sulfametoksazol dari PT. Kalbe Farma



FP/MA/009/3

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product : Sulfamethoxazole BP(Micronized) A.R. No. : SMX/3084/09
 Batch No. : 30841109 In-House B.No. : Nov/SMX/100
 Date of Mfg. : Nov 2009 Sampled by : P.S.Rao
 Date of Exp. : Oct 2014 Date of Analysis : 11.11.2009
 Batch Quantity : 40 X 25 Kg = 1000 Kg L/c No.014ITSY011815
 Invoice No.: E/SMX/359/2009-2010 Date : 16.11.2009

S.No.	Tests	Observations	Specifications
01	Description	White crystalline powder	A white or almost white crystalline powder.
02	Solubility	Complies	As per BP
03	Identification:		
	a) Melting point	170.9°C	169.0°C – 172.0°C
	b) IR	Positive	The IR absorption spectrum of Sample Should be concordant with the spectrum of Sulfamethoxazole CRS.
	c) TLC	Complies	As per BP
	d) Chemical test (Azo dye)	Complies	Should give positive reaction of primary Aromatic amines.
04	Appearance of Solution	Complies	Not more intensely coloured than reference solutions Y ₅ , BY ₅ or GY ₅
05	Acidity	0.12 ml	Not more than 0.3 ml of 0.1M NaOH
06	Related substances by TLC	Less than 0.5%	Not more than 0.5%
07	Heavy metals	Less than 20 ppm	Not more than 20 ppm
08	Loss on Drying	0.22%w/w	Not more than 0.5% w/w
09	Sulphated ash	0.05%w/w	Not more than 0.1% w/w
10	Assay	100.32%w/w	Not less than 99.0 % and not more than 101.0 %, calculated on dried basis.
11	Additional tests		
	a) Particle size (by Malvern Laser Diffraction Dry Powder Method)	100% < 35.566 Microns	100% < 40 Microns
	b) Bulk density		

Remarks : The sample Complies as per BP 2004 specification No. FP/SP/009

Date of Release: 11.11.2009

Analysed by

Q.C. Manager

11.11.09

Factory, Regd. Off.: Plot No. 4 to 10, S.V. Co-op. Industrial Estate, IDA, Jeedimetla, Hyderabad-500 055, India.
 Phones : 44445678, 44445600, 23096688, 23098206, Grams: 'VIRCO' Fax : 91-(040) 23096677, 23098205.
 E-mail : hvd1_virchow@sancharnet.in, http://www.virchows.com

Lampiran 5

Sertifikat analisis trimetoprim dari PT. Kalbe Farma

SHOUGUANG FUKANG
PHARMACEUTICAL CO., LTD.寿光富康制药有限公司 杨雍园
SHOUGUANG FUKANG PHARMACEUTICAL CO., LTDShandong shouguang economy and technology development zone, P.R. of china
Tel: 86-536-5108180 fax: 86-536-5101568

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT	TRIMETHOPRIM	PHARMACOPOLeia	BP2002
BATCH NO.	200909396	GROSS WEIGHT	27.5Kg/Drum
BATCH QUANTITY	500KGS	NET WEIGHT	25Kg/Drum
MANUFACTURE DATE	SEP. 09. 2009	EXPIRY DATE	AUG. 2014
ANALYSIS DATE	SEP. 10. 2009	EXPORT DATE	SEP. 11. 2009
TEST ITEM	STANDARDS REQUIRED		TEST RESULTS
[Characters] Appearance Solubility	White or yellowish-white powder very slightly soluble in water, slightly soluble in alcohol.		yellowish-white powder very slightly soluble in water, slightly soluble in alcohol.
[Identification] A: Melting point B: specific absorbance C: IR-spectrum D: chemical reaction Appearance of solution	199—203°C max. 287nm: 240—250 Complies with reference spectrum green fluorescence at 365nm not more intensely colored than reference solution BY ₁		201.0—201.5°C 244 Complies with reference spectrum green fluorescence at 365nm less intensely colored than reference solution BY ₁
[Related substances] HPLC method A: impurity F any impurity single total impurities HPLC method B: any impurity single total impurities Heavy metals Residual methanol Residual DMSO Residual acetic acid GC impurity K(aniline) Loss on drying Sulphated ash Assay	≤0.1% ≤0.1% ≤0.2% ≤0.1% ≤0.2% ≤20PPM ≤3000PPM ≤5000PPM ≤5000PPM ≤5PPM ≤1.0% ≤0.1% 98.5—101.0%		0.03% <0.1% <0.2% <0.1% <0.2% <20PPM below detection limit below detection limit below detection limit below detection limit 0.2% 0.02% 99.6%
Results: The commodity meets the standard of BP2002			

QA Manager: Liu Bin

Checker: Yang Dong Run

Examiner: Liu Fang