

OPTIMASI PROSES DIAZOTASI UNTUK PENENTUAN *CHLORAMPHENICOL* SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Yuni Astria, Bohari Yusuf dan Moh. Syaiful Arif*
Program Studi Kimia FMIPA Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua Samarinda, 75123
Email correspondence: syaifularif88@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian tentang optimasi proses diazotasi untuk penentuan *Chloramphenicol* secara Spektrofotometri UV-Vis telah dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah membentuk garam diazonium dengan Sulfanilamid sebagai sumber garam diazonium dan direaksikan dengan asam nitrit diikuti dengan proses diazotasi serta dikopling dengan *Chloramphenicol*. Hasil penelitian ini adalah terbentuknya senyawa azo berwarna kuning jernih yang dapat diukur pada panjang gelombang 400,941 nm. Senyawa ini stabil apabila direaksikan pada temperatur di bawah 10°C. Kondisi optimum dapat diperoleh dengan melakukan proses diazotasi menggunakan 3 mL Sulfanilamid, 3 mL HCl dan 6 mL NaNO₂ serta waktu pengoplingan untuk pembentukan senyawa azo selama 8 menit.

Kata Kunci: *Chloramphenicol*, *Sulfanilamid*, *diazotasi*, *Spektrofotometri UV-Vis*.

PENDAHULUAN

Negara Indonesia dikenal sebagai negara maritim dan sangat kaya akan hasil lautnya baik itu udang, lobster, ikan serta berbagai jenis kekayaan laut lainnya. Karena banyaknya hasil dan kekayaan perairan, Indonesia melakukan ekspor hasil perairan ke negara-negara besar termasuk Eropa, Amerika, Jepang dan sebagainya. Permintaan akan hasil laut seperti ikan dan udang meningkat setiap tahunnya, sehingga membuat produksi udang di Indonesia pun semakin meningkat pula. Upaya peningkatan produksi udang seringkali dilakukan melalui usaha pertambakan. Dalam usaha pertambakan tersebut, masalah yang sering dijumpai di lapangan adalah adanya bakteri yang dapat mengganggu produksi dan pada akhirnya merugikan para petambak [1].

Di Indonesia, penggunaan obat antibiotik Chloramphenicol (CAP) sering dicampurkan ke dalam pakan ternak udang. Hal ini sebenarnya dilarang penggunaannya, karena residu antibiotik dalam udang tersebut bila dikonsumsi oleh manusia akan mengakibatkan penyakit yang sangat membahayakan [2].

Chloramphenicol (CAP) adalah salah satu jenis antibiotik yang sangat luas penggunaannya yang berfungsi untuk mengobati bermacam-macam infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen. CAP memiliki sifat sebagai bakteristatik dan pada konsentrasi tinggi kadang-kadang bersifat sebagai bakterisid terhadap

kuman-kuman tertentu [3][4]. Antibiotik ini mulanya berasal dari bakteri *Streptomyces venezuelae* yang telah diisolasi oleh David Gottlieb dan diperkenalkan ke dunia klinis dengan nama dagang *Chloromycetin* dan banyak digunakan pada tahun 1950-an (Madhavan, 2014)[5].

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033 Tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan yang mengatur mengenai bahan tambahan pangan yang diizinkan dan bahan tambahan pangan yang dilarang, CAP dilarang penggunaannya untuk hewan. Batasan yang dianjurkan oleh Pemerintah *United Kingdom* tentang residu CAP dalam bahan makanan adalah dibawah 10 ppb. Adapun ambang batas CAP di dalam tubuh hewan yang masih diperbolehkan yaitu sebesar 0,3 ppb[6].

Berdasarkan uraian tersebut, timbul keinginan untuk melakukan pengembangan metode untuk menganalisis antibiotik Chloramphenicol. Dimana analisis akan dilakukan dengan metode spektrofotometri UV Vis berbasis reaksi diazotasi. Untuk mendapatkan hasil yang optimal maka peneliti melakukan optimasi terhadap reagen sebagai sumber garam diazonium serta waktu kopling.

METODOLOGI PENELITIAN

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, Spektrofotometer UV-Vis *Evolution 201*, *hotplate stirer*, pipet ukur,

pipet gondok, labu ukur, gelas ukur, gelas kimia, labu Erlenmeyer, gelas arloji, corong gelas, spatula, pipet tetes, batang pengaduk dan botol semprot.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk *Chloramphenicol* (Merck), Sulfanilamid (Merck), NaNO_2 (Merck), HCl (Merck), akuades, etanol (Merck) dan es batu

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum CAP

Pengukuran panjang gelombang maksimum CAP dilakukan dengan menyiapkan larutan CAP 100 ppm. Selanjutnya larutan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada daerah panjang gelombang UV 200-400 nm menggunakan blanko etanol

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Senyawa Azo Sulfanilamid-CAP

Dipipet 3,0 mL larutan sulfanilamid 0,3 % dimasukkan ke dalam gelas kimia 50 mL. Selanjutnya ditambahkan berturut-turut larutan 3,0 mL HCl 1,0 M dan 5,0 mL NaNO_2 1%. Larutan dicampur dengan baik dan dibiarkan pada suhu kamar selama 3 menit agar terjadi reaksi diazotasi. Selanjutnya larutan ditambahkan 2,0 mL CAP 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan diaduk selama 5 menit dalam suhu dingin. Senyawa azo yang dihasilkan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas kemudian diukur panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada daerah tampak 380 – 700 nm. Blanko yang digunakan adalah reagen yang terdiri dari sulfanilamid, HCl, NaNO_2 , tanpa CAP. Panjang gelombang yang menghasilkan nilai serapan maksimum merupakan panjang gelombang maksimum dari senyawa azo sulfanilamid-CAP.

Optimasi Waktu Kopling

Disiapkan lima buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan sebanyak 3,0 mL Sulfanilamid 0,3%. Kemudian ditambahkan larutan HCl 1,0 M sebanyak 3 mL dan larutan NaNO_2 1% sebanyak 5 mL. Larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL CAP 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lalu diaduk dengan variasi waktu 5, 6, 7, 8 dan 10 menit dalam suhu dingin. Diencerkan dalam labu takar 25 mL lalu diukur absorbansi panjang masing-masing larutan dengan variasi volume tersebut menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada

panjang gelombang maksimum senyawa azo Sulfanilamid-CAP.

Optimasi Volume Sulfanilamid

Disiapkan lima buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan sebanyak 1,0; 2,0; 3,0 dan 5,0 mL Sulfanilamid 0,3%. Kemudian ditambahkan larutan HCl 1,0 M sebanyak 3 mL dan larutan NaNO_2 1% sebanyak 5 mL. Larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL CAP 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lalu diaduk selama 8 menit (hasil optimasi) dalam suhu dingin. Diencerkan dalam labu takar 25 mL lalu diukur absorbansi panjang masing-masing larutan dengan variasi volume tersebut menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum senyawa azo Sulfanilamid-CAP.

Optimasi Volume HCl

Disiapkan lima buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan 3 mL (hasil optimasi) larutan Sulfanilamid 0,3%. Kemudian ditambahkan 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 mL larutan HCl 1,0 M dan 5,0 mL larutan NaNO_2 1%. Larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL CAP 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lalu diaduk selama 8 menit (hasil optimasi) dalam suhu dingin. Diencerkan dalam labu takar 25 mL lalu diukur absorbansi panjang masing-masing larutan dengan variasi volume tersebut menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum senyawa azo Sulfanilamid-CAP.

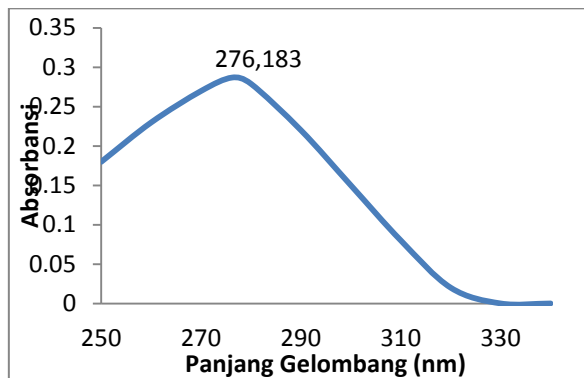
Optimasi Volume NaNO_2

Disiapkan lima buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan 3 mL (hasil optimasi) larutan sulfanilamid 0,3%. Kemudian ditambahkan 3 mL larutan HCl 1,0 M dan 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 dan 7 mL larutan NaNO_2 1%. Larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL CAP 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lalu diaduk selama 8 menit (hasil optimasi) suhu dingin. Diencerkan dalam labu takar 25 mL lalu diukur absorbansi panjang masing-masing larutan dengan variasi volume tersebut menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum senyawa azo Sulfanilamid-CAP.

HASIL DAN PEMBAHASAN

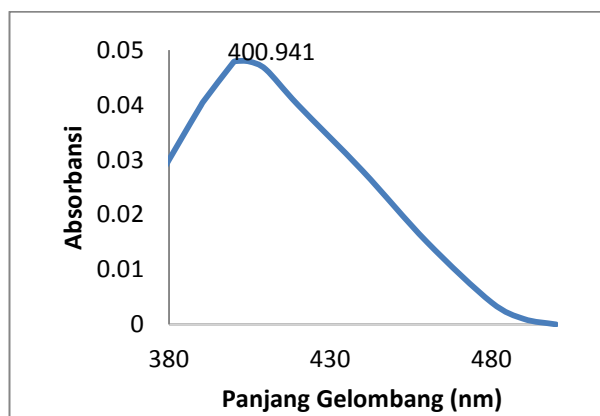
Penentuan Panjang Gelombang Maksimum CAP

Pada penentuan panjang gelombang maksimum CAP murni diperoleh panjang gelombang maksimum CAP 276,183 nm.



Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Senyawa Azo Sulfanilamid- CAP

Pada penentuan panjang gelombang maksimum senyawa azo ini diperoleh panjang gelombang 400,941 nm.

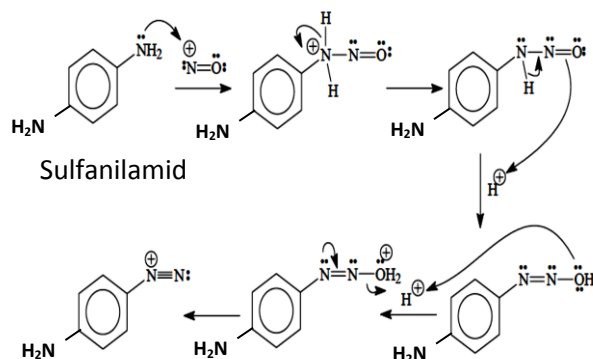


Pada pembentukan senyawa azo ini mengalami dua tahap reaksi dimana tahap yang pertama adalah adanya reaksi diazotasi sulfanilamid pada waktu direaksikan dengan HCl dan NaNO₂ sehingga menghasilkan garam diazonium. Adanya reaksi diazotasi ini disebabkan oleh sulfanilamid yang memiliki gugus amina primer pada cincin aromatisnya. Dimana amina primer ini akan bereaksi dengan asam nitrit melalui ion nitrosonium hasil reaksi dari HCl dan NaNO₂. Pada tahap pertama ini larutan harus tercampur dengan baik dengan cara pengocokan supaya gas nitrit yang dihasilkan

dapat melepaskan diri karena kelebihan nitrit bisa mempengaruhi senyawa azo yang terbentuk.

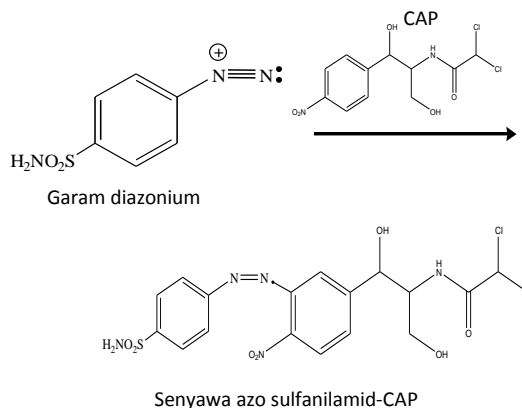
Pada umumnya reaksi diazotasi berjalan dalam suhu rendah di bawah 10°C, karena garam diazonium yang sudah terbentuk memiliki sifat yang mudah mengalami dekomposisi. Pada penelitian ini reaksi diazotasi dilakukan pada suhu dingin yaitu pada temperatur ±3°C.

Mekanisme reaksi pembentukan garam diazonium adalah sebagai berikut:



Gambar 1. Mekanisme reaksi pembentukan garam diazonium [7].

Pada tahap yang kedua, kation pada garam diazonium yang telah terbentuk akan mengalami reaksi kopling dengan senyawa CAP sehingga menghasilkan senyawa azo sulfanilamid-CAP. Reaksi kopling ini harus segera dilakukan untuk menghindari terjadinya dekomposisi karena reaksi ini berlangsung spontan.



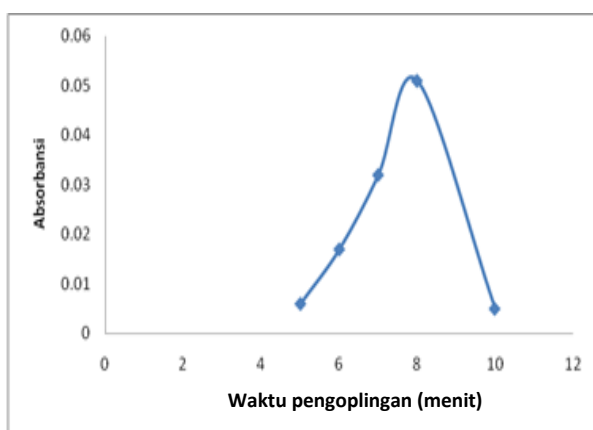
Gambar 2. Dugaan mekanisme reaksi kopling pembentukan senyawa azo Sulfanilamid-CAP

Pada reaksi kopling di atas, garam diazonium yang bertindak sebagai elektrofili

menyerang gugus aromatis yang dikelilingi oleh awan elektron dan terikat pada posisi para dikarenakan adanya efek sterik dari gugus N_2O .

Optimasi Waktu Kopling

Penentuan waktu kopling sangat penting untuk dilakukan. Hal ini dikarenakan untuk mengetahui berapa waktu optimal yang dibutuhkan agar CAP dapat terkopling dengan baik dengan garam diazonium. Pada penelitian ini digunakan variasi waktu 5, 6, 7, 8 dan 10 menit. Grafik pengukuran dapat dilihat pada Gambar 3.

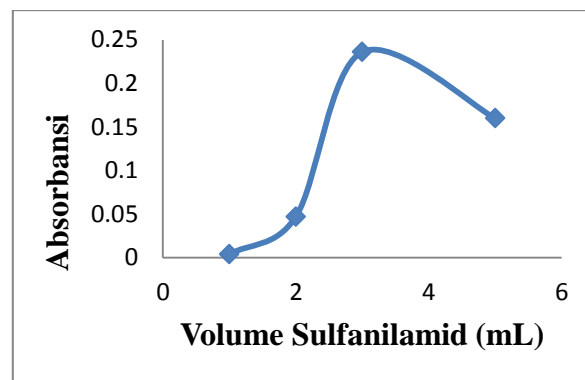


Gambar 3. Optimasi Waktu Kopling

Berdasarkan grafik pengukuran absorbansi yang diperoleh pada Gambar 3, terlihat bahwa, pada waktu 5 sampai 8 menit terjadi kenaikan absorbansi dan setelah lebih dari 8 menit terjadi penurunan absorbansi. Dalam hal ini 8 menit merupakan waktu optimum dan dianggap cukup untuk membentuk senyawa azo ketika garam diazonium dikopling dengan CAP. Jika waktu kurang dari waktu optimum maka reaksi kopling berjalan tidak sempurna dan belum mencapai kesetimbangan untuk membentuk senyawa azo. Jika waktu kopling melebihi waktu optimum terjadi penurunan intensitas serapan hal ini dikarenakan pada waktu ini dianggap telah melebihi waktu pengoplingan sehingga tidak begitu berpengaruh secara signifikan terhadap kenaikan.

Optimasi Volume Sulfanilamid

Pada optimasi ini, digunakan volume sulfanilamid yang bervariasi yaitu 1, 2, 3 dan 5 mL. Hasil optimasi dapat dilihat pada Gambar 4.

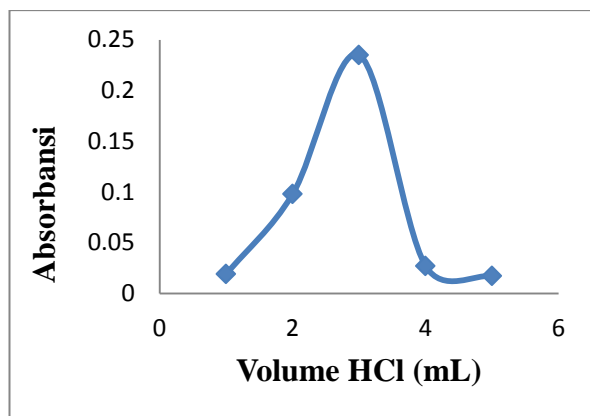


Gambar 4. Optimasi volume Sulfanilamid

Berdasarkan grafik yang diperoleh, volume 1 sampai 3 mL mengalami kenaikan intensitas serapan. Sedangkan lebih dari 3 mL terjadi penurunan serapan. Dalam hal ini 3 mL merupakan volume optimum dan dianggap mampu bereaksi dan menghasilkan ion diazonium yang nantinya akan bereaksi dengan pengkopling CAP. Dimana apabila volume Sulfanilamid kurang dari volume optimum maka serapannya tidak optimal dan reaksi tidak berlangsung sempurna dan tidak dapat digunakan untuk menentukan kandungan CAP secara kuantitatif. Adapun jika volume terlalu besar maka akan terjadi penurunan intensitas serapan hal ini dikarenakan konsentrasi Sulfanilamid 0,3% pada volume ini dianggap telah melebihi jumlah ekuivalen secara stoikiometri untuk bereaksi dengan CAP sehingga tidak begitu berpengaruh secara signifikan terhadap kenaikan.

Optimasi Volume HCl

Optimasi volume HCl sangat perlu dilakukan untuk mengetahui jumlah asam yang dibutuhkan untuk dapat bereaksi dengan $NaNO_2$ membentuk ion nitrosonium yang akan direaksikan dengan Sulfanilamid sebagai sumber garam diazonium. Dimana apabila volume HCl kurang dari volume optimum maka HCl tidak cukup bereaksi dengan $NaNO_2$ untuk menghasilkan ion nitrosonium dan senyawa azo yang terbentuk serapannya tidak maksimal. Namun, bila volume HCl melebihi volume optimum maka dapat mempercepat terbentuknya asam nitrit dan mudah terdekomposisi membentuk gas nitrit. Selain itu konsentrasi HCl yang terlalu besar juga dapat menyebabkan keasaman larutan meningkat dan berpengaruh pada pembentukan senyawa azo pada saat dilakukan pengkoplingan [8]. Hasil optimasi volume HCl dapat dilihat pada Gambar 5.



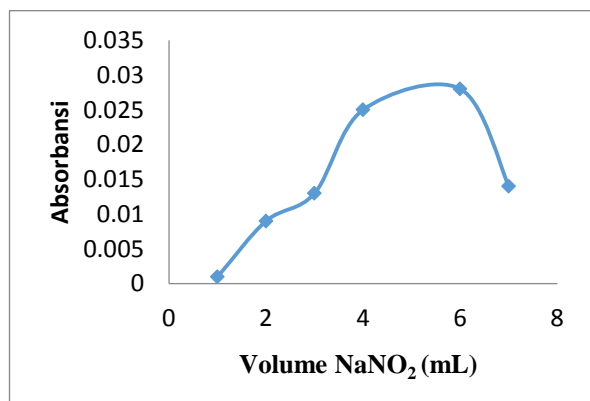
Gambar 5. Optimasi volume HCl

Berdasarkan grafik yang diperoleh, volume 1 sampai 3 mL mengalami kenaikan intensitas serapan. Sedangkan lebih dari 3 mL terjadi penurunan serapan. Sehingga serapan yang optimal yaitu 3 mL dan dianggap mampu bereaksi serta menghasilkan ion diazonium yang akan direaksikan dengan pengkopling CAP.

Optimasi Volume NaNO₂

Optimasi volume NaNO₂ dilakukan untuk mengetahui volume optimum NaNO₂ yang diperlukan agar dapat bereaksi dengan HCl sehingga menghasilkan ion nitrosonium yang akan bereaksi dengan gugus amina primer pada sulfanilamid sebagai sumber garam diazonium.

Pada optimasi ini digunakan variasi volume NaNO₂ dengan variasi 1, 2, 3, 4, 6 dan 7 mL. Hasil serapan yang diperoleh terdapat pada Gambar 6.



Gambar 6. Optimasi volume NaNO₂

Berdasarkan grafik pada Gambar 6 terjadi kenaikan intensitas serapan dari volume 1 hingga 6 mL dan terjadi penurunan intensitas serapan pada volume 7. Dalam hal ini 6 mL merupakan volume optimum dan dianggap mampu bereaksi

dan menghasilkan ion diazonium yang nantinya akan bereaksi dengan pengkopling CAP. Apabila volume NaNO₂ kurang dari volume optimum maka NaNO₂ tidak cukup bereaksi dengan HCl untuk menghasilkan ion nitrosonium dan senyawa azo yang terbentuk serapannya tidak maksimal. Namun, bila volume NaNO₂ melebihi volume optimum maka dapat mempercepat terbentuknya asam nitrit yang akan mengurai menjadi ion nitrosonium serta gas NO₂ dan gas N₂O₃ yang mudah menguap dan dapat mengurangi jumlah ion nitrosonium yang akan bereaksi dengan sulfanilamid sehingga mempengaruhi pembentukan senyawa azo dan intensitas serapannya tidak maksimal.

Pada penelitian ini digunakan volume NaNO₂ yang lebih besar daripada volume sumber garam diazoniumnya agar dapat menyediakan ion nitrosonium yang cukup dan diperoleh serapan maksimal pada waktu direaksikan dengan gugus amina primer yang terikat pada posisi para dalam cincin aromatis Sulfanilamid ketika bereaksi dengan pengkopling CAP.

KESIMPULAN

1. Sulfanilamid dapat dijadikan sebagai sumber garam diazonium pada pembentukan senyawa azo untuk mendeteksi CAP secara spektrofotometri UV-Vis berbasis reaksi diazotasi.
2. Volume optimum dari reagen yang akan digunakan untuk penentuan CAP secara Spektrofotometri UV-Vis adalah 3 mL Sulfanilamid 0,3%, 3 mL HCl 1 M serta 6 mL NaNO₂ 1% untuk jangkauan konsentrasi CAP 20-100 µg/mL

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Painte, Riri Esther. 2008. *Analisis Pengaruh Hambatan Tarif dan Non Tarif di Pasar Uni Eropa Terhadap Ekspor Komoditas Udang Indonesia*. Institut Pertanian Bogor.
- [2] Islamulhayati, Soedjajadi Keman dan Ririh Yudhastuti. 2005. *Pengaruh Residu Khloramfenikol Dalam Udang Windu Terhadap Kejadian Anemia Aplastik Pada Mencit*. Jurnal Kesehatan Lingkungan. Vol 1. No.2.
- [3] Gun, S. 1995. *Farmakologi dan Terapi. edisi IV (Edisi Perbaikan)*. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta.

- [4] Tan, H. T. dan K. Raharja. 1981. *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya Edisi Keempat*. Jakarta: Dirjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [5] HN, Madhavan dan Bhagyalakshmi R. Farewell. 2014. *CAP? Is this True? : A Review. Research and Reviews. Journal of Microbiology and Biotechnology*. 3(1). Hal. 13–26.
- [6] Comission Decision No. 2003/181/EC of 13 March. 2003. *Amending Decision 2002/657/EC as Regards the Setting of Minimum Performance Limits (Mprls) for Certain Residues in food Animal Origin (2003). Official Journal of the European Union L71/17*
- [7] Daley, R.F. dan Daley, S.J. 2005. *Organic Chemistry*. www.ochem4free.com. Hal. 953- 956.
- [8] Yazid, Edy Agustian, Ganden Supriyanto dan Tjitjik Srie Tjahjandarie. 2014. *Development Of Spectrophotometric Method For Allopurinol In Urine Based On The Diazotation Reaction. The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. Vol 18. No. 1. Hal. 212-220.