

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS *CHLORAMPENICOL* SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS BERBASIS REAKSI DIAZOTASI PADA SUHU DINGIN

DEVELOPMENT OF *CHLORAMPENICOL* ANALYTICAL METHOD UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY BASED ON THE DIAZOTATION REACTION AT COLD TEMPERATURES

Indra Kurniawan*, Bohari Yusuf, Moh. Syaiful Arif

Program Studi S1 Kimia, FMIPA, Universitas Mulawarman
Jalan Barong tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua, Samarinda-Indonesia

*Corresponding Author, email: indra77.ik@gmail.com

ABSTRACT

Development of chloramphenicol analytical method UV-VIS spectrophotometry based on the diazotation reaction at cold temperatures has been carried out. In this study, a coupling reaction was carried out between diazonium salt sourced from sulfanilamide and chloramphenicol, diazonium salt was made by reacting sodium nitrite and HCl with sulfanilamide. In the manufacturing process and the coupling reaction between diazonium salt and chloramphenicol was carried out at cold temperatures and the resulting compound was stable at $\pm 10^{\circ}\text{C}$. The compound formed was an azo sulfanilamide-CAP compound and was measured by UV-Vis spectrophotometry at a wavelength of 400,941 nm.

Keywords: *diazotation reaction, chloramphenicol, Spectrophotometry UV-Vis.*

ABSTRAK

Pengembangan metode analisis *chloramphenicol* secara spektrofotometri UV-VIS berbasis reaksi diazotasi pada suhu dingin telah dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan reaksi kopling antara garam diazonium yang bersumber dari sulfanilamid dengan *chloramphenicol*, garam diazonium dibuat dengan mereaksikan natrium nitrit dan HCl dengan sulfanilamid. Pada proses pembuatan dan reaksi kopling antara garam diazonium dengan *chloramphenicol* dilakukan pada suhu dingin dan juga senyawa yang dihasilkan stabil pada suhu $\pm 10^{\circ}\text{C}$. Senyawa yang terbentuk tadi berupa senyawa azo sulfanilamid-CAP dan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400,941 nm.

Kata kunci: *reaksi diazotasi, chloramphenicol dan spektrofotometri UV-Vis.*

PENDAHULUAN

Budidaya perairan telah banyak dikembangkan di Indonesia dan menjadi salah satu mata pencaharian masyarakat. Tetapi banyak kendala yang dialami oleh peternak, seperti serangan bakteri, sehingga dapat mengganggu produksi dan merugikan para peternak. Untuk menanggulangnya para peternak menggunakan antibiotik yang sering kali dicampurkan ke dalam makanan hewan ternak.

Salah satu jenis antibiotik yang sering digunakan yaitu *chloramphenicol*. yang mana antibiotik ini memiliki kegunaan yang cukup beragam dalam mengobati infeksi yang disebabkan bakteri patogen [1][2]. Penggunaan *chloramphenicol* pada komoditas perikanan

(udang-udangan dan ikan) telah merebak di pasaran lokal, regional maupun internasional sehingga menghambat bahkan menggagalkan ekspor terutama udang dari Indonesia ke berbagai negara di dunia [3].

Chloramphenicol adalah suatu golongan antibiotik yang menghambat pertumbuhan bakteri. Tetapi pada kadar yang tinggi dapat juga bersifat bakterisidal [4]. Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No. 806/Kpts/TN.260/12/94 mengenai Klasifikasi Obat Hewan, CAP dikategorikan ke dalam obat keras untuk hewan. *European Union* atau komisi negara Uni Eropa memberikan batasan dalam penggunaan *chloramphenicol* sebesar 0,3 ppb [5].

Dari uraian diatas, maka perlu dilakukan analisa yang cepat, mudah dan murah untuk mengukur konsentrasi *chloramphenicol* pada hewan ternak yang akan dipasarkan ke pasaran. Dimana pada penelitian ini dilakukan optimasi pada reagen guna mengetahui reagen dan waktu reaksi yang optimum untuk bereaksi serta mengetahui linearitas serta sensitivitas metode.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat- yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik, spektrofotometer UV-Vis *evolution 201*, *Hotplate stirrer*, sentrifuse, pipet ukur, pipet volume, labu ukur, gelas kimia, labu erlenmeyer, gelas arloji, corong gelas, spatula, pipet tetes, batang pengaduk, dan botol semprot.

Bahan

Adapun bahan yang digunakan antara dalam penelitian ini adalah, *chloramphenicol* (Merck), sulfanilamid (Merck), natrium nitrit (Merck), asam klorida pekat (Merck), es batu dan garam.

Panjang Gelombang Maksimum *Chloramphenicol*

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

Panjang Gelombang Maksimum Senyawa Azo Sulfanilamid-*Chloramphenicol*

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 NaNO₂ 1%. Larutan dicampur dengan baik dan dibiarkan pada suhu kamar selama 3 menit agar terjadi reaksi diazotasi. Selanjutnya larutan ditambahkan 2,0 mL *chloramphenicol* 500 µg/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 tera 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, NaNO₂, tanpa *chloramphenicol*. Panjang gelombang yang menghasilkan nilai serapan

maksimum merupakan panjang gelombang maksimum dari senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol*.

Pengaruh Waktu Koping Pembentukan Senyawa Azo

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 NaNO₂ 1% sebanyak 5 mL. Larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL *chloramphenicol* 500 µg/mL kemudian diaduk dengan variasi waktu 1, 2, 3, 4 dan 5 menit.

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 NaNO₂ 1% sebanyak 5 mL. Kemudian larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL *chloramphenicol* 500 µg/mL kemudian diaduk sesuai waktu optimum yang diperoleh pada prosedur 3.5.3 dalam suhu dingin. Selanjutnya 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-*chloramphenicol*.

Optimasi Volume HCl

Disiapkan lima buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan larutan sulfanilamid 0,3% dengan volume optimum yang diperoleh pada prosedur 3.5.4 nomor 1. Kemudian ditambahkan 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 mL larutan HCl 1,0 M dan 5,0 mL larutan NaNO₂ 1%. Kemudian larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL *chloramphenicol* 500 µg/mL kemudian diaduk sesuai waktu optimum yang diperoleh pada prosedur 3.5.3 dalam suhu dingin. Selanjutnya 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-*chloramphenicol*.

Optimasi Volume NaNO_2

Disiapkan lima buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan larutan sulfanilamid 0,3% dengan volume optimum yang diperoleh pada prosedur 3.5.4 nomor 1. Kemudian ditambahkan larutan HCl 1,0 M dengan volume optimum yang diperoleh pada prosedur 3.5.4 nomor 2 dan 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 dan 6,0 mL larutan NaNO_2 1%. Kemudian larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 2,0 mL *chloramphenicol* 500 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diaduk sesuai waktu optimum yang diperoleh pada prosedur 3.5.3 suhu dingin. Selanjutnya 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-*chloramphenicol*.

Pembuatan Kurva Kalibrasi *Chloramphenicol*

Disiapkan lima buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan 3 mL larutan sulfanilamid 0,3%. Kemudian ditambahkan 3 mL larutan HCl 1,0 M dan 6 mL larutan NaNO_2 1%. Kemudian larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 dan 4,0 mL *chloramphenicol* 500 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diaduk selama 8 menit. selanjutnya diencerkan dalam labu takar 25 mL dan dihomogenkan sehingga diperoleh konsentrasi *Chloramphenicol* 20 $\mu\text{g/mL}$; 30 $\mu\text{g/mL}$; 40 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 60 $\mu\text{g/mL}$; 70 $\mu\text{g/mL}$ dan 80 $\mu\text{g/mL}$. Lalu diukur absorbansi panjang masing-masing larutan dengan variasi volume tersebut menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum senyawa azo Sulfanilamid-*Chloramphenicol*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum *Chloramphenicol*

Pada pengukuran panjang gelombang maksimum, pengukuran dilakukan pada rentang 200-400 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan didapatkan hasil pengukuran pada panjang gelombang 276,183 nm.

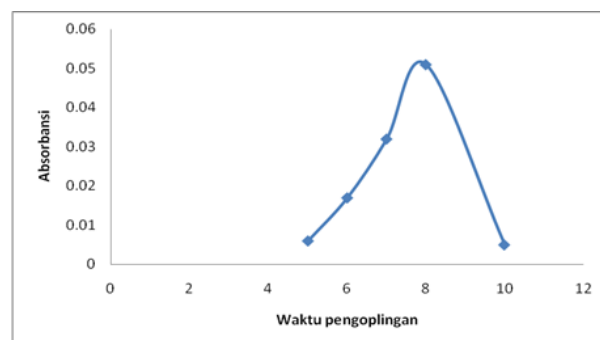
Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Senyawa Azo Sulfanilamid-*Chloramphenicol*

Pada pengukuran panjang gelombang maksimum senyawa azo sulfanilamid-

chloramphenicol dilakukan pada rentang 400-500 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis didapatkan hasil pengukuran pada panjang gelombang 400,941 nm. Terjadi pergeseran yang sebelum pada panjang gelombang 276,183 nm yaitu pada daerah sinar uv menjadi panjang gelombang 400,941 nm yaitu pada daerah sinar tampak, ini menandakan telah terjadi reaksi kopling antara garam diazonium dan *chloramphenicol* menghasilkan senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol*.

Pengaruh Waktu Kopling Pembentukan Senyawa Azo

Optimasi waktu kopling dilakukan untuk mengetahui waktu optimum yang dibutuhkan untuk mereaksikan senyawa diazonium dengan *chloramphenicol* dan menghasilkan senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol*. Adapun gambar grafik pada optimasi waktu kopling senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol* sebagai berikut:

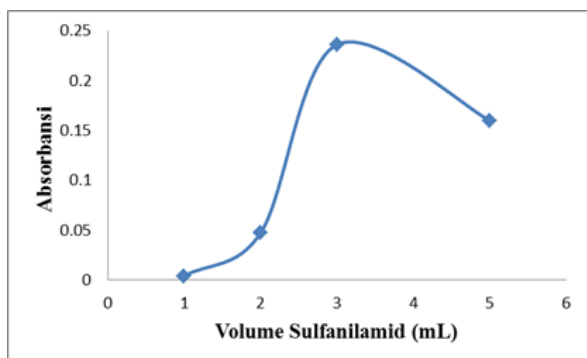


Gambar 1. Optimasi waktu kopling

Berdasarkan gambar grafik diatas didapatkan waktu 8 menit sebagai waktu optimum untuk terbentuknya senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol* dimana pada pengujian 5 menit sampai 8 menit mengalami kenaikan intensitas serapan yang signifikan sedangkan pada pengukuran 10 menit mengalami penurunan intensitas serapan.

Optimasi Volume Sulfanilamid

Sulfanilamid digunakan sebagai sumber garam diazonium yang akan dikopling dengan *chloramphenicol* sebagai analit yang ditentukan kadarnya. Pada penelitian ini digunakan sulfanilamid dengan konsentrasi 0,3%.

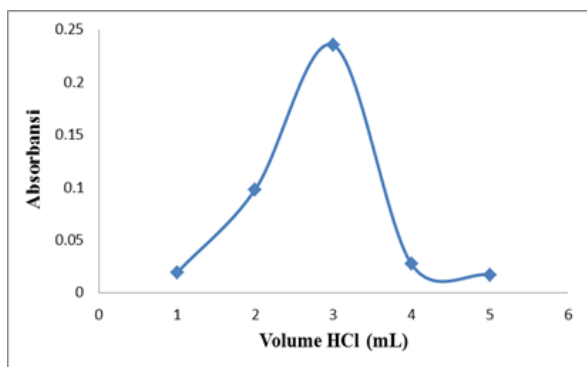


Gambar 2. Grafik Optimasi Volume Sulfanilamid

Berdasarkan grafik diatas didapatkan volume optimum sulfanilamid yaitu 3 mL. Dimana pada volume sulfanilamid 1 sampai 3 mL terjadi kenaikan intensitas serapan yang signifikan dan pada volume 4 sampai 5 mulai terjadi penurunan intensitas serapan.

Optimasi Volume HCl

Optimasi volume HCl dilakukan untuk mengetahui banyaknya asam yang dibutuhkan untuk bereaksi dengan NaNO_2 yang akan menghasilkan ion nitrosonium. Pada penelitian ini digunakan HCl dengan konsentrasi 0,1 M. Adapun grafik hasil pengukuran intensitas serapan pada optimasi volume HCl sebagai berikut:



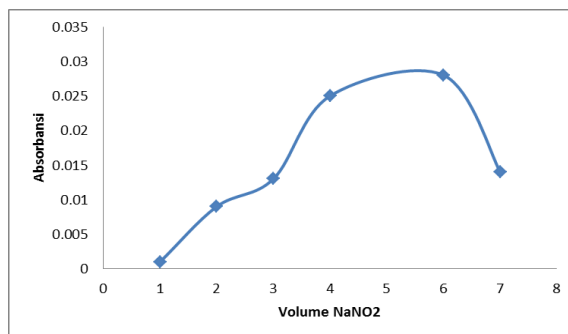
Gambar 3. Grafik Optimasi Volume HCl

Berdasarkan grafik diatas didapatkan volume optimum HCl 0,1M ialah 3 mL. Dimana intensitas serapan pada volume 1 mL sampai 3 mL mengalami kenaikan yang signifikan sedangkan pada volume 4 mL terjadi penurunan intensitas serapan.

Optimasi Volume NaNO_2

Optimasi volume NaNO_2 dilakukan untuk mengetahui volume asam nitrit yang optimum untuk bereaksi dengan HCl untuk membentuk ion nitrosonium yang optimum dan akan bereaksi

dengan gugus amina primer pada sulfanilamid sebagai sumber garam diazonium. Konsentrasi NaNO_2 yang digunakan ialah 1 %.

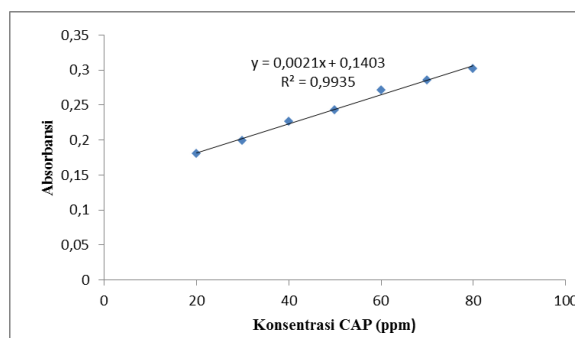


Gambar 4. Grafik Optimasi Volume NaNO_2

Berdasarkan grafik diatas, didapatkan volume optimum NaNO_2 yaitu 6 mL. Dimana pada volume 1 mL sampai 6 mL terjadi kenaikan intensitas serapan yang signifikan sedangkan pada volume NaNO_2 7 mL terjadi penurunan intensitas serapan.

Penentuan Kurva kalibrasi

Pada penentuan kurva kalibrasi dilakukan pengukuran konsentrasi CAP dengan variasi yang berbeda yaitu 20-80 g/mL. Berdasarkan hasil pengukuran yang dilakukan, didapatkan persamaan regresi linear $y = 0,0021x + 0,1403$, dimana y sebagai absorbansi dan x sebagai konsentrasi CAP. Adapun nilai koefisien korelasi dari persamaan regresi linear yaitu $R^2 = 0,9935$ dan terlihat bahwa kurva kalibrasi yang dihasilkan menunjukkan linearitas. Menurut Riyanto [6], jika koefisien determinasi (R) semakin mendekati 1 maka kurva tersebut memiliki linearitas yang baik. Adapun kurva kalibrasi penentuan CAP sebagai berikut:



Gambar 5. Penentuan Kurva Kalibrasi

Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi

matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel [7]. Pada perhitungan linearitas menggunakan uji t. Berdasarkan perhitungan dengan uji t didapatkan nilai t hitung > dari nilai t tabel, maka terdapat korelasi linear antara konsentrasi CAP dan absorbansi.

Sensitivitas

Sensitivitas ditentukan dari harga slope (b) yang berasal dari regresi linier kurva standar $y = bx + a$ [8]. Berdasarkan nilai persamaan regresi linier, didapatkan nilai sensitivitas sebesar 0,0021 ppm dimana nilai sensitivitas didapatkan dari nilai slope dari persamaan regresi.

KESIMPULAN

1. Berdasarkan penelitian didapatkan volume optimum reagen antara lain 3 mL sulfanilamid 0,3 %, 3 mL HCl 0,1 M, dan 6 mL NaNO₂ 1% pada rentang pengukuran 20 – 80 ppm.
2. Didapatkan hasil linearitas yang baik dengan nilai sensitivitas sebesar 0,0021 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] 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.
- [2] Gun, S. 1995. *Farmakologi dan Terapi. edisi IV (Edisi Perbaikan)*. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta.
- [3] Islamulhayati, Soedjadi dan R. Yudhastuti. 2005. *Pengaruh Residu Khloramfenikol Dalam Udara Windu Terhadap Kejadian Anemia Aplastik Pada Mencit*. Jurnal Kesehatan Lingkungan, Vol 1, No 2.
- [4] Katzung, BG. *Basic & clinical pharmacology*. 10th ed. United States: Lange Medical Publications; 2007
- [5] Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009, 2010. *On Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin*. Official Journal of the European Union L15, 1-72.
- [6] Riyanto, 2014. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Edisi 1. Cetakan 1. Yogyakarta: Deepublish.
- [7] Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vol. 1, no. 3, hal 117-135.
- [8] Diarti, Maruni Wiwin. Danuyanti, I Gusti Ayu Nyoman . Sumantri, I Gede Billy. 2015. *Senyawa Pengkupling α -Nafthilamin Untuk Validasi Metode Spektrofotometri Penentuan Nitrit (NO₂⁻) Di Dalam Air*. Jurnal Kesehatan Prima. Vol. 9 No. 1. Hal. 1457 – 1469.