

50/93

B. b-6

C2.

Laporan Penelitian

PEMISAHAN DAN PENGUJIAN AKTIFITAS
MIKROBIOLOGI BEBERAPA SENYAWA HASIL URAI
RIFAMPISINA DALAM LARUTAN AIR

43

AK

Oleh :

DRS. AKMAL, MS. APT
FAKULTAS MIPA JURUSAN FARMASI



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS ANDALAS
Padang, 1993

PEMISAHAN DAN PENGUJIAN AKTIFITAS MIKROBIOLOGI
BEBERAPA SENYAWA HASIL URAI RIFAMPISINA DALAM LARUTAN AIR

A k m a l

Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Andalas Padang

A B S T R A K

Telah dilakukan pemisahan dan pengujian aktifitas mikrobiologi beberapa senyawa hasil urai rifampisina dalam larutan air. Pemisahan dilakukan dengan teknik ekstraksi cair-cair dan kromatografi lapis tipis preparatif, sedangkan pengujian aktifitas mikrobiologi dilakukan dengan cara penetapan potensi dengan metode difusi-agar menggunakan bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Dari percobaan telah berhasil dipisahkan senyawa hasil urai rifampisina yaitu rifampisina kuinon dan dua senyawa lain yang diduga 3-formil rifampisina dan 25-desasetil rifampisina. Ketiga senyawa hasil urai ini mempunyai aktifitas mikrobiologi jauh lebih rendah daripada rifampisina.

PENDAHULUAN

Antibiotika pada umumnya merupakan senyawa kimia yang tidak stabil, strukturnya mudah berubah selama proses pembuatan ataupun penyimpanannya sebagai obat maupun sebagai bahan baku obat. Oleh karena itu kontrol kualitas sangat diperlukan terutama pengujian-pengujian yang langsung menggambarkan aktifitas mikrobiologinya, sehingga penggunaannya dalam pelayanan kesehatan masyarakat tidak menimbulkan efek yang merugikan.

Rifampisina merupakan salah satu obat pilihan (Drug of choice) dalam penanggulangan penyakit tuberkulosis yang sangat luas pemakaiannya di Indonesia (Wattimena, 1987).

Dalam bentuk serbuk kering yang disimpan pada suhu 25°C rifampisina stabil selama lebih dari 5 tahun, bahkan masih stabil pada penyimpanan sampai suhu 70°C asal di luar pengaruh oksigen dari udara (Hidayat, 1991). Dalam larutan air dengan pH 2,30 yang disimpan pada suhu 20-22°C rifampisina terurai membentuk 3-formil rifamisina, pH 8,20 terurai membentuk rifampisina kuinon dan pH 13,12 (NaOH 5% dalam etanol-air 1:1) terurai membentuk 25-desasetil rifampisina, sedangkan pada suasana netral pH 7,40 relatif stabil (Florey, 1976).

Mengingat bahwa rifampisina di pasaran banyak ditemui dalam bentuk larutan air (sirop), diduga selama penyimpanan dan distribusinya dapat terjadi penguraian rifampisina membentuk berbagai hasil urainya. Terjadinya penguraian ini dapat menurunkan aktifitas mikrobiologinya dan kemungkinan hal ini merupakan salah satu penyebab timbulnya resistensi bakteri yang akhir-akhir ini banyak dilaporkan. Sejauh mana terjadinya penurunan aktifitas mikrobiologi rifampisina akibat penguraian ini belum pernah diteliti. Bertitik tolak dari kenyataan diatas, pada percobaan ini telah dilakukan pemisahan dan pengujian aktifitas mikrobiologi beberapa senyawa hasil urai rifampisina dalam larutan air.

BAHAN DAN METODE

Bahan baku yang digunakan pada percobaan ini diperoleh dari Polfa Tarchomin (Warszawa). Pemeriksaan bahan baku dilakukan berdasarkan monografi yang tertera dalam "The International Pharmacopoeia (1988)" meliputi : kelarutan, titik leleh, identitas, susut pengeringan, keasaman, kadar dan potensinya. Sebagai baku pembanding digunakan "chemical reference" dan "biological reference" yang direkomendasi oleh Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Sebagai bakteri uji digunakan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan media perbenihan Nutrient Agar (Difco). Pelarut dan pereaksi yang digunakan adalah dengan derajat pro-analisis.

Pada percobaan ini sebanyak dua gram bahan baku rifampisina diuraikan pada pH 2,30; 7,40; 8,20 dan 13,12 dan disimpan dalam inkubator suhu 20-22°C selama 30 hari. Kemudian masing-masing larutan diekstraksi dengan 1.000 ml etil asetat, fraksi etil asetat ditambah tiga gram natrium sulfat eksikatus, dikocok dan disaring dengan kertas saring rangkap. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan bantuan rotary-evaporator, dikeringkan dalam oven pada suhu tidak lebih dari 50°C hingga terbentuk serbuk hablur. Serbuk hablur ini mengandung rifampisina dan senyawa hasil urainya pada masing-masing kondisi penyimpanan. Untuk memisahkan masing-masing komponen hasil urai dilakukan dengan teknik kromatografi lapis tipis prepatif, menggunakan pelarut

pengembang kloroform-metanol (85:15) dan fasa diam silika gel GF 254. Senyawa hasil urai yang telah dipisahkan dimurnikan dengan cara rekristalisasi, kemudian ditentukan spektrum serapan inframerah dan ultraviolet-visibelnya. Pengujian aktifitas mikrobiologi dilakukan dengan cara penetapan potensi dengan metode difusi agar menggunakan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sebagai mikroba uji, perhitungan potensi dilakukan menurut pola blok rawu.

HASIL DAN DISKUSI

Dalam larutan air pada berbagai kondisi penyimpanan, rifampisina terurai membentuk berbagai senyawa hasil urainya yaitu : pada pH 2,30 dengan suhu 20-22^oC membentuk tiga senyawa hasil urai, pH 7,40 membentuk satu senyawa hasil urai, pH 8,20 membentuk satu senyawa hasil urai dan pH 13,12 membentuk dua senyawa hasil urai, seperti terlihat pada kromatogram Gambar 1.

Pada percobaan ini telah berhasil dipisahkan tiga macam senyawa hasil urai (A, B dan C) dalam jumlah yang cukup memadai untuk dilakukan analisis selanjutnya, sedangkan beberapa senyawa lainnya sukar untuk dipisahkan karena jumlahnya terlalu kecil. Senyawa A dipisahkan dari larutan dengan pH 2,30, senyawa B dari larutan dengan pH 8,20 dan senyawa C dari larutan dengan pH 13,12.

Senyawa A berupa serbuk hablur berwarna merah-gelap dan tidak berbau. Spektrum serapan inframerah dalam tablet kalium bromida pada bilangan gelombang: 3450, 2970, 2930, 2820, 2300, 1705, 1570, 1280 dan 1025 (Gambar 2). Spektrum serapan ultraviolet-visibel dalam larutan dapar fosfat pH 7,40 memberikan puncak serapan pada panjang gelombang : 220,0; 319,0 dan 483,0 nm (Gambar 3). Berdasarkan data ini dan dibandingkan dengan data yang diperoleh dari pustaka, diduga senyawa A ini adalah 3-formil rifamisina.

Senyawa B berupa hablur berwarna hitam dan tidak berbau. Spektrum serapan inframerah dalam tablet kalium bromida pada bilangan gelombang : 3450, 3350, 2970, 2925, 2290, 1710, 1670, 1610, 1570, 1550, 1520, 1250 dan 1080 (Gambar 4). Spektrum serapan ultraviolet-visibel dalam larutan dapar fosfat pH 7,40 memberikan puncak serapan pada panjang gelombang: 260,0; 328,5 dan 475,5 nm (Gambar 5). Berdasarkan data ini dan dibandingkan dengan data yang diperoleh dari pustaka, dapat dipastikan bahwa senyawa B ini adalah rifampisina kuinon.

Senyawa C berupa serbuk hablur berwarna coklat-terang dan tidak berbau. Spektrum serapan inframerah dalam tablet kalium bromida pada bilangan gelombang : 3500, 2915, 2840, 2300, 1700, 1670, 1610, 1560, 1540 dan 1520 (Gambar 6). Spektrum serapan ultraviolet-visibel dalam larutan dapar fosfat pH 7,40 memberikan puncak serapan pada panjang gelombang: 211,5; 317,0 dan 432,0 nm (Gambar 7). Berdasarkan

data ini, senyawa C diduga adalah 25-desasetil rifampisina. Namun dugaan ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut dan diperlukan baku pembanding dari senyawa hasil urai.

Dari pengujian aktifitas mikrobiologi senyawa hasil urai yang telah dipisahkan, terlihat adanya penurunan potensi dibandingkan dengan senyawa asalnya (rifampisina). Senyawa A mempunyai potensi sebesar 843,505 UI/mg atau 88,74 % terhadap potensi awal (Tabel 1). Senyawa B mempunyai potensi sebesar 136,894 UI/mg atau 14,40 % terhadap potensi awal (Tabel 2), sedangkan senyawa C tidak mempunyai potensi sama sekali (Tabel 3). Profil penurunan potensi masing-masing senyawa hasil urai dapat dilihat pada Gambar 8. Terjadinya penurunan potensi ini kemungkinan disebabkan oleh karena terjadinya perubahan struktur molekul dari masing-masing senyawa hasil urai dibandingkan dengan rifampisina dalam bentuk utuh.

KESIMPULAN

Telah dipisahkan tiga macam senyawa hasil urai rifampisina dalam larutan air yaitu rifampisina kuinon dan dua senyawa lain yang diduga 3-formil rifampisina dan 25-desasetil rifampisina. Ketiga senyawa hasil urai ini mempunyai aktifitas mikrobiologi yang lebih rendah daripada rifampisina.

DAFTAR PUSTAKA

- Arret. B., et al., 1971. Outline of Details for Microbiological Assays of Antibiotics, *J. Pharm. Sci.*, 60:11, 1689-1694.
- Asiatin, A., 1988. Effect of Ascorbic Acid, α -tocopherol and Citric Acid as Antioxidant of Rifampicin Potency in Suspension, *Proceeding 12 th. Asian Congress of Pharmaceutical Sciences*, Denpasar, 118.
- Florey, K. (Ed.), 1976. Rifampin In: Analytical Profile of Drug Substances, Academic Press, New York, 470-505.
- Hidayat, U.W., 1991. Formulasi Suspensi Rifampisina dan Gambaran Ketersediaan Hayatinya. Tesis Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung, Bandung, 1-25.
- Kavanagh, F.W., 1974. Microbiological Diffussion Assay, Operation Studied with Cooper Equation, *J. Pharm. Sci.*, 63:11, 1459-1563.
- Kim, S.J., 1984. Bioavailability of Rifampicin Preparations, The Korean National Tuberculosis Association, Seoul, 11-12.
- Pescok, R.L., et al., Modern Methods of Chemical Analysis, 2nd. ed., John Willey & Sons, New York, 29-38.
- Wattimena, J. R., et al., 1987. Farmakodinami dan Terapi Antibiotika, Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung, Bandung, 172-177.
- World Health Organization, 1988. The International Pharmacopoeia, Vol. 3, World Health Organization, Geneva, 279-280.
- World Health Organization, 1991. Rifampicin Quinon, *Analytical Report*, 555:12, 59-63.
- World Health Organization, 1991. 3-formyl rifamycin, *Analytical Report*, 555:12, 55-59