

OPTIMASI PROSES REDUKSI KLORAMFENIKOL MENGGUNAKAN REDUKTOR Zn DENGAN SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis

OPTIMIZATION OF CHLORAMPHENICOL REDUCTION USING Zn AS REDUCTOR BY SPECTROPHOTOMETRY UV-Vis

Fadillah Firda Azizah*, Maria Monica Sianita B., Ganden Supriyanto

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

State University of Surabaya

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, email: fadila_azizah@yahoo.co.id

Abstrak. Penelitian tentang optimasi proses reduksi kloramfenikol menggunakan reduktor Zn dengan Spektrofotometri UV-Vis dan Fourier Transformed Infra Red (FTIR) telah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah mengubah gugus nitro aromatik pada kloramfenikol menjadi gugus amina primer yang diikuti proses diazotasi dan pengkopling menggunakan N-(1-Naphtyl)ethylendiamine dihydrochloride (NEDA) sebagai pengkopling. Hasil akhir penelitian ini adalah terbentuknya senyawa azo yang dapat diukur pada panjang gelombang 560-568 nm. Senyawa ini stabil apabila proses reduksi dilakukan pada temperatur di bawah 10°C. Kondisi optimum proses reduksi dapat diperoleh dengan mereduksi 100 ppm kloramfenikol menggunakan 3 gram Zn dalam 2,5 ml asam format.

Kata kunci: kloramfenikol, reduktor Zn, diazotasi, spektrofotometri, NEDA.

Abstract. Research about optimization of chloramphenicol reduction process using zinc (Zn) as reductor by Spectrophotometry UV-Vis and Fourier Transformed Infra Red (FTIR) has been conducted. The purpose of this research is to convert the nitro aromatic group in chloramphenicol into primary amine group followed by diazotization and coupling process using N-(1-Naphtyl)ethylendiamine dihydrochloride (NEDA) as a coupling agent. The final result of this research is the formation of azo compound measured at 560-568 nm. This compound is stable when the reduction process is conducted at temperature below 10°C. The optimum condition of the reduction process can be obtained by reducing 100 ppm of chloramphenicol using 3 gram of Zn in 2.5 ml of formic acid.

Keywords: chloramphenicol, reductor Zn, diazotization, spectrophotometry, NEDA.

PENDAHULUAN

Kloramfenikol merupakan antibiotik berspektrum luas yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein bakteri, karena itu sering digunakan dalam sektor perikanan. Kloramfenikol banyak digunakan pada ikan/udang untuk mengatasi berbagai macam penyakit yang berasal dari golongan parasit, bakteri, virus, dan jamur yang muncul pada organisme budidaya seperti udang dan ikan. Penyakit pada organisme tersebut muncul disebabkan oleh penimbunan senyawa organik di dasar tempat budidaya, oleh karena itu pembudidaya sering menggunakan antibiotik untuk mengatasinya, salah satunya yaitu kloramfenikol. Tetapi pemberian antibiotik secara terus menerus dapat menimbulkan resisten bakteri patogen terhadap antibiotik sintetik[1].

Akumulasi residu antibiotik berpotensi merusak kesehatan manusia yang mengkonsumsinya[2].

Pada manusia, kloramfenikol digunakan dalam pengobatan demam tifoid, disamping tiamfenikol dan ampisilin/amoksisilin karena efektif, murah, mudah didapat, dan dapat diberikan secara oral. Namun pemakaian kloramfenikol juga dapat menimbulkan efek samping. Kloramfenikol juga memiliki efek samping pada manusia yaitu dapat menyebabkan penyakit gangguan saluran cerna, *anemia aplastik*, alergi, dan resistensi[3].

Adanya efek samping kloramfenikol pada manusia tersebut menyebabkan badan pengawasan obat dan produk-produk makanan di Amerika Serikat (FDA) melarang penggunaan kloramfenikol tersebut pada hewan yang dikonsumsi oleh manusia [4], sedangkan komisi

negara Uni Eropa (*European Union*) memberi batasan penggunaan kloramfenikol sebesar 0,3 mg/kg (0,3 ppb)[5].

Pada umumnya identifikasi kloramfenikol dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) namun membutuhkan biaya yang sangat mahal, waktu lama dan juga lebih rumit. Berdasarkan uraian di atas perlu adanya pengembangan metode untuk analisis kloramfenikol yang lebih mudah, sederhana, akurat dan biaya yang lebih murah. Pada penelitian ini akan dilakukan pengembangan metode analisis kloramfenikol secara spektrofotometri UV-Vis dengan prinsip reaksi diazotasi, dimana gugus nitro pada kloramfenikol akan direduksi menggunakan Zn dan asam menjadi gugus amina primer. Gugus amina primer inilah yang kemudian melewati reaksi diazotasi. Diazotasi adalah reaksi antara amina primer dengan asam nitrit. Asam nitrit diperoleh dari hasil reaksi natrium nitrit dan asam klorida. Reaksi amina primer dengan asam nitrit pada suhu dingin membentuk garam diazonium [6]. Selanjutnya garam ini direaksikan dengan menambahkan pengkopling *N*-(1-Naphtyl) ethylendiamine dihydrochloride (NEDA) agar terbentuk senyawa azo yang berwarna violet yang dapat dideteksi pada panjang gelombang 560-568 nm.

Umumnya penelitian-penelitian yang telah dilakukan tidak mengoptimasi proses reduksi yang terjadi. Mustafa (2007) hanya mengidentifikasi kloramfenikol murni menggunakan reduktor Zn dan HCl dan metode spektrofotometri UV-Vis. Padahal optimasi proses reduksi tersebut berperan penting dalam pembentukan senyawa azo yang berwarna.

Adapun yang dioptimasi adalah jenis asam, massa reduktor, jumlah asam dan konsentrasi kloramfenikol.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan

Spektrofotometer FT-IR, Spektrofotometri UV-Vis, neraca digital, *magnetic stirrer*, vortex, spatula, kaca arloji, botol gelap, vial, tabung reaksi, rak tabung, gelas kimia, gelas ukur, corong, Erlenmeyer, pipet volume, pipet tetes, pinset, labu ukur, kertas saring whatman, dan termometer.

Bahan yang digunakan

HCl (Merck), asam format (Merck), aquades, aquabidest, etanol (Merck), kloramfenikol (Sigma), reduktor Zn (Merck), N-(1-naphtyl)ethylendiamine dihidroklorida

(Merck), ammonium sulfamat (Merck), NaNO₂ (Sigma) dan es batu.

PROSEDUR PENELITIAN

Optimasi Jenis Asam Pada Proses Reduksi Kloramfenikol

Pada penelitian ini 5 ml CAP 1.000 ppm ditambah 3 g Zn dan 2,5 ml HCl. Kemudian distirer sampai 20 menit, setelah itu disaring dan filtrat yang diperoleh diencerkan sampai 10 ml. Lalu diambil 5 ml dan ditambah 1 ml HCl, 1 ml NaNO₂ dan 1 ml ammonium sulfamat (tiap penambahan divortex). Reaksi dilakukan dalam penangas es pada suhu <10°C. Filtrat yang diperoleh diencerkan kembali sampai 10 ml. Kemudian disimpan dalam lemari es, pengujian Spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR dilakukan setelah 1 hari penyimpanan. Diulangi prosedur tersebut dengan mengganti HCl dengan asam format pada awal penambahan. Jenis asam yang memberikan hasil terbaik digunakan pada proses optimasi berikutnya.

Optimasi Massa Reduktor Pada Proses Reduksi Kloramfenikol

Pada penelitian ini 5 ml CAP 1.000 ppm ditambah 3 g Zn dan 2,5 ml asam (hasil optimasi jenis asam). Kemudian distirer sampai 20 menit, setelah itu disaring dan filtrat yang diperoleh diencerkan sampai 10 ml. Lalu diambil 5 ml dan ditambah 1 ml HCl, 1 ml NaNO₂ dan 1 ml ammonium sulfamat (tiap penambahan divortex). Reaksi dilakukan dalam penangas es pada suhu <10°C. Filtrat yang diperoleh diencerkan kembali sampai 10 ml. Kemudian disimpan dalam lemari es, pengujian Spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR dilakukan setelah 1 hari penyimpanan. Diulangi prosedur tersebut dengan mengganti massa Zn menjadi 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 dan 3,5 gram. Massa reduktor yang memberikan hasil terbaik digunakan pada proses optimasi berikutnya.

Optimasi Jumlah Asam Pada Proses Reduksi Kloramfenikol

Pada penelitian ini 5 ml CAP 1.000 ppm ditambah 3 g Zn (hasil optimasi massa) dan 2,5 ml asam (hasil optimasi jenis asam). Kemudian distirer sampai 20 menit, setelah itu disaring dan filtrat yang diperoleh diencerkan sampai 10 ml. Kemudian diambil 5 ml dan ditambah 1 ml HCl, 1 ml NaNO₂ dan 1 ml ammonium sulfamat (tiap penambahan divortex). Reaksi dilakukan dalam penangas es pada suhu <10°C. Filtrat yang diperoleh diencerkan kembali sampai 10 ml.

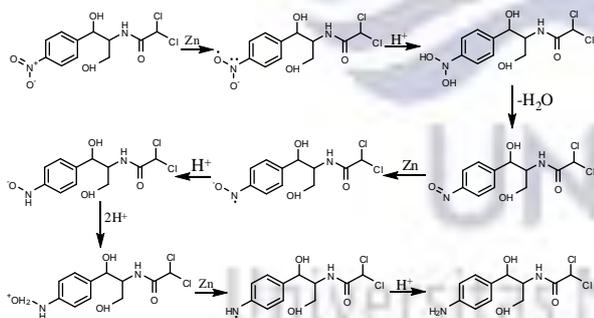
Kemudian disimpan dalam lemari es, pengujian Spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR dilakukan setelah 1 hari penyimpanan. Diulangi prosedur tersebut dengan mengganti jumlah asam menjadi 2; 3; 3,5 dan 4 ml. Jumlah asam yang memberikan hasil terbaik digunakan pada proses optimasi berikutnya.

Optimasi Konsentrasi Kloramfenikol Pada Proses Reduksi Kloramfenikol

Pada penelitian ini 5 ml CAP 1.000 ppm ditambah 3 g Zn (hasil optimasi massa) dan 2,5 ml asam (hasil optimasi jumlah & jenis asam). Kemudian distirer sampai 20 menit, setelah itu disaring dan filtrat yang diperoleh diencerkan sampai 10 ml. Lalu diambil 5 ml dan ditambah 1 ml HCl, 1 ml NaNO₂ dan 1 ml ammonium sulfamat (tiap penambahan divortex). Reaksi dilakukan dalam penangas es pada suhu <10° C. Filtrat yang diperoleh diencerkan kembali sampai 10 ml. Kemudian disimpan dalam lemari es, pengujian Spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR dilakukan setelah 1 hari penyimpanan. Diulangi prosedur tersebut dengan mengganti konsentrasi kloramfenikol setelah pengenceran menjadi 40, 60, 80, dan 100 ppm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada proses reduksi kloramfenikol ini gugus nitro pada kloramfenikol diubah menjadi gugus amina. Mekanisme reaksi reduksi kloramfenikol ditampilkan pada gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme reaksi reduksi kloramfenikol

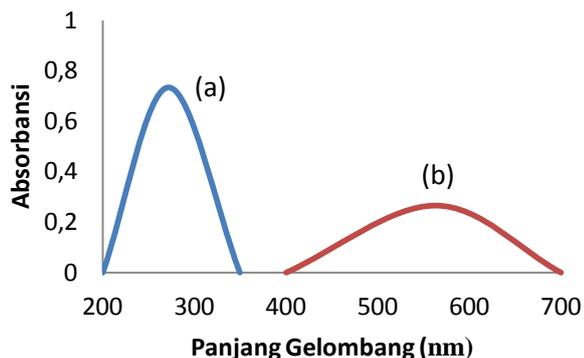
Kloramfenikol murni dan kloramfenikol tereduksi dikarakterisasi dengan FTIR. Tujuan karakterisasi dengan FTIR adalah untuk mengamati perubahan gugus fungsi dari kloramfenikol murni dan kloramfenikol tereduksi. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada gambar 10.

Tabel 1. Perbedaan spektrum FTIR kloramfenikol murni dan kloramfenikol tereduksi (Day dan A.L. Underwood, 2002)

No	Bilangan gelombang	Gugus	Gugus	
			Murni	Tereduksi
1	3580-3650	OH	+	+
2	~1600	C=C	+	+
3	1300-1400	NO	+	-
4	3300-3700	NH	-	+

Pada tabel 1 terlihat bahwa kloramfenikol murni terdapat pada bilangan gelombang 1350 cm⁻¹ yang merupakan pita vibrasi khas dari gugus NO₂. Sedangkan pada kloramfenikol tereduksi puncak tersebut tidak muncul. Pita vibrasi khas spektra FTIR amina primer untuk N-H ulur (stretch) terdapat pada daerah bilangan gelombang 3300-3700 cm⁻¹ yang baru muncul pada kloramfenikol tereduksi.

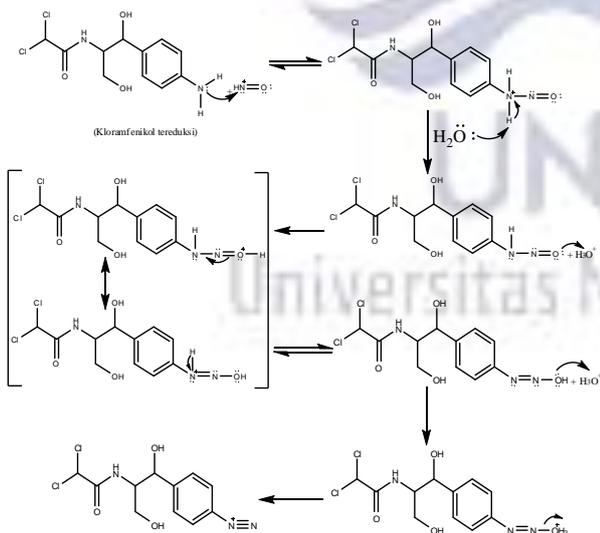
Larutan natrium nitrit (NaNO₂) dan asam klorida (HCl) dimasukkan ke dalam larutan kloramfenikol tereduksi pada tabung reaksi. Reaksi dilakukan pada penangas es dengan suhu <15 °C. Garam diazonium pada reaksi diazotasi memiliki stabilitas yang rendah. Reaksi diazotasi sebaiknya dilakukan pada suhu rendah <15 °C[13]. NaNO₂ dan HCl menghasilkan asam nitrit (HONO) prekursor ion nitrosonium (NO⁺). Ion tersebut akan bereaksi dengan kloramfenikol tereduksi untuk pembentukan garam diazonium sebelum ditambahkan agen pengkopling, larutan tersebut diberi ammonium sulfamat terlebih dahulu. Ammonium sulfamat disini berfungsi untuk menghilangkan/mengurangi gas nitrit yang dihasilkan. Setelah itu agen pengkopling NEDA dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Hasil reaksi azo kopling antara garam diazonium dengan NEDA adalah larutan berwarna ungu violet. Larutan tersebut diukur dengan spektrofotometri UV-Vis sehingga didapatkan panjang gelombang maksimum yaitu 554 nm seperti gambar 2.



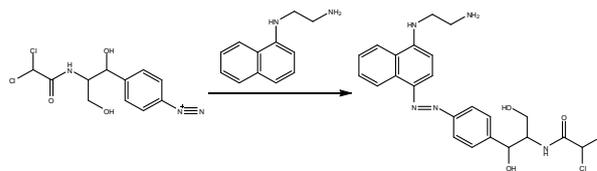
Gambar 2. Panjang gelombang maksimum (a) kloramfenikol dan (b) senyawa azo kloramfenikol tereduksi-NEDA

Mekanisme reaksi pembentukan garam diazonium kloramfenikol tereduksi terdapat pada gambar 3. Garam diazonium merupakan elektrofil yang bereaksi dengan agen pengkopling NEDA (nukleofil) yang memiliki gugus pelepas elektron NH_2 . Nitrogen terminal garam diazonium menyerang pada posisi para dari NEDA. Reaksi pembentukan senyawa azo dari kloramfenikol tereduksi terdapat dalam gambar 4.

Intensitas warna senyawa azo dipengaruhi oleh adanya gugus kromofor dan ausokrom. Gugus kromofor dan ausokrom pada senyawa azo ini berturut-turut adalah $(\text{N}=\text{N})$ dan (NH_2) . Gugus kromofor adalah gugus penganan warna, dan gugus ausokrom adalah gugus fungsional yang mengintensifkan warna.



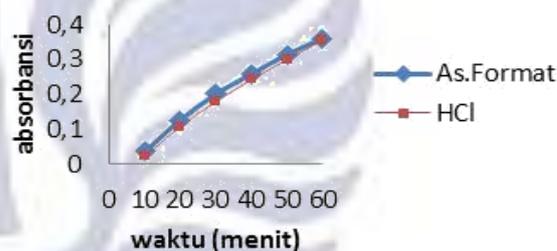
Gambar 3. Mekanisme reaksi pembentukan garam diazonium kloramfenikol tereduksi



Gambar 4. Reaksi pembentukan senyawa azo dari kloramfenikol tereduksi

Penentuan jenis asam pada proses reduksi kloramfenikol

Penentuan jenis asam pada proses reduksi kloramfenikol untuk mengetahui efektivitas jenis asam yang digunakan sebagai sumber H^+ . Sangat penting untuk mengetahui efektivitas jenis asam, karena H^+ yang terbentuk akan mempengaruhi proses reduksi kloramfenikol. Karina (2014) menggunakan reduktor Zn dan HCl untuk mereduksi gugus nitro dalam nitrofuram, dan Gowda (2001) menggunakan reduktor Zn dan asam format untuk mereduksi gugus nitro. Pada penelitian ini digunakan 2 jenis asam yaitu asam klorida (HCl) dan asam format (HCOOH).

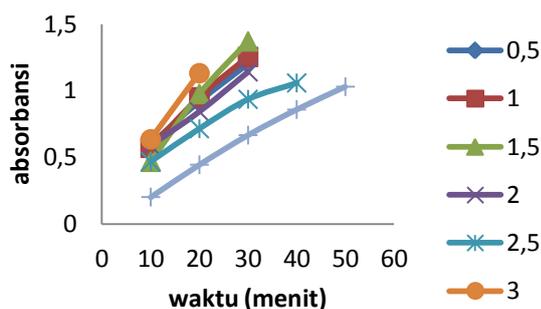


Gambar 5. Grafik perbandingan pengukuran absorbansi asam format dan HCl

Pada gambar 5 terlihat bahwa proses reduksi dengan menggunakan asam format memiliki sensitivitas yang lebih tinggi daripada proses reduksi yang menggunakan HCl. Dengan kata lain, asam format lebih optimum dalam mereduksi gugus nitro pada kloramfenikol menjadi gugus amina primer dibandingkan dengan HCl.

Penentuan massa Zn pada proses reduksi kloramfenikol

Penentuan massa Zn pada proses reduksi kloramfenikol sangat penting karena jumlah massa menentukan jumlah mol reduktor yang dapat mereduksi gugus nitro pada kloramfenikol. Pada penelitian ini digunakan reduktor Zn dengan variasi massa antara lain 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 dan 3 g. Grafik pengukuran absorbansi dengan variasi massa Zn terdapat pada gambar 6.



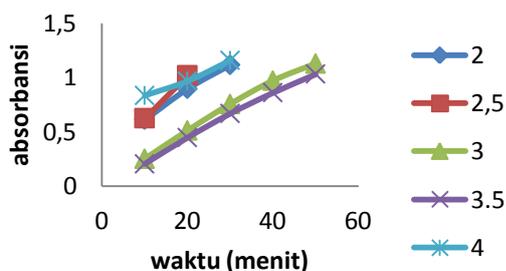
Gambar 6. Grafik pengukuran absorbansi dengan variasi massa

Pada gambar 6 terlihat bahwa absorbansi pada massa 0,5; 1; 1,5; dan 2 g mencapai 1 pada menit ke-30, sedangkan pada massa 2,5 g absorbansi mencapai 1 pada menit ke-40, pada massa 3 g absorbansi mencapai 1 pada menit ke-20, dan pada massa 3,5 g absorbansi mencapai 1 pada menit ke-50. Hal tersebut menunjukkan bahwa Zn dengan massa 3 g lebih sensitif daripada massa-massa yang lain.

Penentuan jumlah asam pada proses reduksi kloramfenikol

Jumlah asam berpengaruh terhadap jumlah H⁺ yang terbentuk. Digunakan variasi jumlah asam antara lain 2; 2,5; 3; 3,5 dan 4 ml karena untuk melihat berapa jumlah asam yang dibutuhkan untuk mereduksi gugus nitro dalam kloramfenikol menjadi gugus amina primer. Grafik pengukuran absorbansi dengan variasi jumlah asam dapat dilihat pada gambar 7.

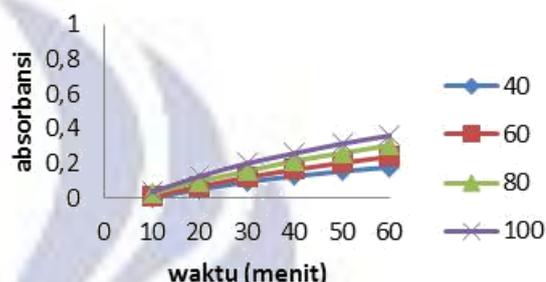
Pada gambar 7 terlihat bahwa absorbansi pada jumlah asam 2 dan 4 ml mencapai 1 pada menit ke-30, sedangkan pada jumlah asam 2,5 ml absorbansi mencapai 1 pada menit ke-20, dan pada jumlah asam 3 dan 3,5 ml absorbansi mencapai 1 pada menit ke-50. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan jumlah asam 2,5 ml lebih sensitif daripada jumlah asam yang lain karena absorbansinya lebih cepat mencapai 1 yaitu pada menit ke-20.



Gambar 7. Grafik pengukuran absorbansi dengan variasi jumlah asam

Penentuan konsentrasi kloramfenikol pada proses reduksi kloramfenikol

Konsentrasi kloramfenikol berpengaruh terhadap seberapa besar pengaruh konsentrasi yang dapat direduksi menjadi gugus amina primer aromatis. Digunakan variasi konsentrasi kloramfenikol antara lain 40, 60, 80 dan 100 ppm karena untuk mendeteksi seberapa tinggi konsentrasi yang dapat terbaca oleh spektrofotometri UV-Vis. Grafik pengukuran absorbansi dengan variasi konsentrasi kloramfenikol terdapat pada gambar 8 dan tabel 2.



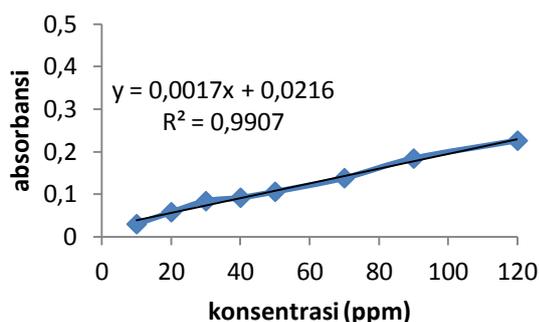
Gambar 8. Grafik pengukuran absorbansi dengan variasi konsentrasi kloramfenikol

Tabel 2. Absorbansi tiap konsentrasi dari menit ke-10 sampai menit ke-60

Menit ke-	Konsentrasi (ppm)			
	40	60	80	100
10	0,004	0,01	0,028	0,037
20	0,052	0,069	0,099	0,128
30	0,095	0,122	0,157	0,202
40	0,128	0,166	0,217	0,26
50	0,157	0,205	0,262	0,316
60	0,18	0,241	0,307	0,362

Pada gambar 8 dan tabel 2 terlihat bahwa absorbansi pada tiap konsentrasi kloramfenikol semakin meningkat dengan bertambahnya waktu. Terlihat pula bahwa absorbansi pada konsentrasi 100 ppm lebih sensitif dibandingkan dengan konsentrasi yang lain.

Dari penentuan parameter analitik diatas, diperoleh kondisi optimum untuk proses reduksi kloramfenikol dalam penelitian ini yaitu massa Zn sebagai reduktor adalah 3 gram; asam yang digunakan adalah asam format sebanyak 2,5 ml, sedangkan konsentrasi kloramfenikol yang digunakan adalah 100 ppm



Gambar 9. Kurva kalibrasi proses reduksi kloramfenikol pada kondisi optimum

Gambar 9 terlihat bahwa kurva kalibrasi tersebut memiliki regresi 0,9907. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kurva kalibrasi tersebut linear pada konsentrasi 10 sampai 120 ppm. Konsentrasi 100 ppm termasuk dalam rentang linearitas tersebut.

PENUTUP

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan antara lain :

1. Jenis asam yang optimum dalam proses reduksi kloramfenikol untuk pembentukan senyawa azo adalah asam format.
2. Massa reduktor Zn yang optimum dalam proses reduksi kloramfenikol untuk pembentukan senyawa azo adalah 3 g.
3. Jumlah asam yang optimum dalam proses reduksi kloramfenikol dengan reduktor Zn untuk pembentukan senyawa azo adalah 2,5 ml asam format (HCOOH).
4. Konsentrasi kloramfenikol yang optimum dalam proses reduksi kloramfenikol dengan reduktor Zn untuk pembentukan senyawa azo adalah 100 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cabello, F. C. 2006. *Heavy Use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture : A Growing Problem for Human and Animal Health and for The Environment*. Journal of Environment Microbiology, 8(7): 1137-1144.
2. Naylor, R., and Burke, M. 2005. *Aquaculture and Ocean Resources: Raising Tigers of the Sea*. Annual Review of Environmental Resources, 30:185-218.
3. FDA. 2002. *Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration*. Topical Kloramfenikol;

4. Extralabel Animal Drug Use; Order of Prohibition, Federal Register 67, 5470-5471.
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. 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. Fessenden, R.J. dan Fessenden J.S. 1992. *Kimia Organik*. Cetakan ketiga. Jilid I. Erlangga:Jakarta.
8. Vogel. 1985. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*. Edisi ke lima. Bagian I. PT Kalman Media Pusaka:Jakarta.
9. Jiang, H and Zhu, S. 2008. Synthesis and Structure of Trifluoromethylated Arylhydrazones Formed from Coupling of 4-(Dimethylamino)-1,1,1-Trifluorobut-3-En-2-One with Diazonium Salts. Journal of Fluorine Chemistry Vol. 129; 40-44.