

RINGKASAN

Validasi Metode KLT-Bioautografi Kontak dan KLT-Densitometri untuk Uji Batas Residu Streptomisin Sulfat dan Kanamisin Sulfat Secara Simultan dalam Ikan Lele (*Clarias batrachus*) dan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Upaya yang dilakukan untuk mengatasi penyakit akibat infeksi bakteri pada perikanan budidaya adalah pemberian antibiotika. Antibiotika yang biasa digunakan adalah streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat (Jiang *et al.*, 2019). Streptomisin terutama digunakan di tempat penetasan telur ikan sebagai perawatan jangka panjang, sedangkan kanamisin digunakan untuk mengobati infeksi kulit ikan (Supriyadi dan Rukyani, 2000; Kuncoro, 2004). *The European Agency for The Evaluation of Medical Products* tidak mengizinkan streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat digunakan untuk mengobati dan mencegah penyakit akibat bakteri pada ikan budidaya. Penyalahgunaan streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat dapat meninggalkan residu dalam jaringan hewan sehingga menyebabkan resistensi antibiotik (Bacanlı dan Başaran, 2019).

Beberapa metode telah dilakukan untuk mendeteksi residu streptomisin dalam berbagai jaringan hewan, yaitu LC-MS dengan batas deteksi 0,025 µg (Tao *et al.*, 2012) dan kromatografi gas dengan batas deteksi 0,005 µg (Stead, 2000). Adapun metode yang digunakan untuk mendeteksi residu kanamisin dalam berbagai jaringan hewan, yaitu ELISA dengan batas deteksi 0,05 µg (Chen *et al.*, 2008) dan HPLC menggunakan detektor UV dengan batas deteksi 0,03 µg (Chen *et al.*, 2009). Namun metode tersebut membutuhkan laboratorium yang memadai dan proses derivatisasi senyawa antibiotika berlangsung beberapa jam sehingga tidak praktis (Jiang *et al.*, 2019). *British Pharmacopoeia* telah menetapkan penggunaan metode KLT untuk mengidentifikasi streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat (British Pharmacopoeia Commission, 2018). Metode kompendial ini diterapkan dan dimodifikasi untuk memperoleh metode sederhana, waktu analisis yang singkat dan praktis untuk analisis secara simultan (Reich dan Maire-Widmer, 2013).

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam daging ikan lele dan ikan nila segar dengan KLT-Bioautografi kontak dan KLT-Densitometri. Parameter validasi metode analisis yang dievaluasi meliputi selektifitas, batas deteksi, linieritas dan akurasi. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode analisis yang valid dan sensitif untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila.

Pada metode KLT-Bioautografi kontak digunakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 sebagai bakteri uji. Berdasarkan Farmakope Indonesia bakteri uji untuk streptomisin sulfat adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 karena metode ini digunakan untuk analisis simultan, maka bakteri yang sama digunakan untuk kanamisin sulfat. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 tumbuh optimum pada pH 7,0-7,5 sehingga pH larutan ekstraksi disesuaikan menjadi 7,0 dengan larutan NaOH 4 M.

Streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat tidak memiliki gugus kromofor sehingga tidak dapat dideteksi menggunakan cahaya UV, maka dilakukan derivatisasi menggunakan ninhidrin untuk analisis menggunakan KLT-Densitometri. Ninhidrin bereaksi dengan gugus amina bebas pada streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat sehingga memberikan warna ungu yang khas (Thenawidjaja, Ismaya dan Soefie, 2017).

Optimasi konsentrasi fase gerak pada penelitian ini meliputi pemilihan konsentrasi fase gerak larutan KH_2PO_4 . Pada konsentrasi 7,5%, nilai Rf kanamisin sulfat berdekatan dengan batas bawah nilai Rf yang baik, yaitu 0,2-0,8. Pada konsentrasi 10%, nilai Rf berada pada rentang nilai Rf yang baik, yaitu 0,2-0,8. Sedangkan pada konsentrasi 12,5%, nilai Rf streptomisin sulfat melebihi dari batas atas nilai Rf yang efektif, yaitu $> 0,8$. Oleh karena itu, konsentrasi 10 % dipilih sebagai konsentrasi fase gerak karena menghasilkan nilai Rf dan Rs lebih baik. Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi fase gerak 7,5%, 10% dan 12,5%, maka ditetapkan konsentrasi fase gerak terpilih yaitu larutan KH_2PO_4 10%. Nilai Rf dan Rs streptomisin sulfat dengan kanamisin sulfat dari kedua metode tersebut sesuai persyaratan nilai Rf yang baik berkisar 0,2-0,8 dan nilai Rs yang baik $\geq 1,0$.

Preparasi sampel ikan lele dan ikan nila membutuhkan larutan ekstraksi untuk mengendapkan protein yang terikat pada streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat. Biasanya larutan TCA 20 % dalam campuran air digunakan untuk pengendapan protein dalam daging ikan. Mekanisme TCA 20 % sebagai agen presipitasi yakni ion negatif dari TCA akan bergabung dengan protein yang sedang berada pada kondisi sebagai kation hingga membentuk garam protein yang tidak larut.

Uji selektifitas dalam penelitian ini dilakukan dengan penambahan larutan standar streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat dalam larutan sampel ikan lele dan ikan nila. Berdasarkan nilai Rs streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat yang ditambahkan ke dalam sampel ikan lele dan ikan nila yang diperoleh dari metode KLT-Bioautografi kontak memenuhi syarat parameter selektifitas dengan nilai Rs masing-masing 1,82 dan 1,81. Pada KLT-Densitometri streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat yang ditambahkan ke dalam sampel ikan lele dan ikan nila memiliki 5 puncak, nilai Rs yang diperoleh dari 5 puncak tersebut memenuhi persyaratan nilai Rs, yaitu $\geq 1,0$.

Data hasil uji batas deteksi metode KLT-Bioautografi kontak untuk streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat masing-masing diperoleh 0,7028 μg dan 0,8032 μg . Sedangkan data hasil uji batas deteksi metode KLT-Densitometri untuk streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat masing-masing diperoleh 0,0631 μg dan 0,0685 μg . Penentuan batas deteksi pada penelitian ini menunjukkan bahwa KLT-Densitometri lebih sensitif dibandingkan KLT-Bioautografi kontak. Hasil ini berbeda dengan batas deteksi yang dilaporkan oleh Hubicka *et al.* (2009), yaitu 0,25 μg untuk analisis kanamisin sulfat dalam produk farmasi menggunakan metode KLT-Densitometri maka nilai batas deteksi yang diperoleh lebih peka. Pada KLT-Bioautografi kontak, hasil yang diperoleh berbeda dengan batas deteksi yang dilaporkan oleh Isnaeni *et al.* (*in process* 2020), yaitu 0,30 μg untuk analisis streptomisin sulfat dalam matriks udang.

Uji linieritas dilakukan pada larutan standar streptomisin sulfat dengan rentang konsentrasi 100,4-301,2 ppm yang menghasilkan persamaan garis regresi $y = 0,0021x + 0,124$ dengan nilai $r = 0,9996$, $R^2 = 0,9994$ dan $V_{x0} = 1,27\%$ untuk KLT-Bioautografi kontak dan $y = 8,4596x + 191,18$ dengan nilai $r = 0,9993$, $R^2 = 0,9988$ dan $V_{x0} = 1,56\%$ untuk KLT-Densitometri. Uji linieritas juga dilakukan pada larutan standar kanamisin sulfat dengan rentang konsentrasi 80,3-301,2 ppm yang menghasilkan persamaan garis regresi $y = 0,0019x - 0,03$ dengan nilai $r = 0,9991$, $R^2 = 0,9983$ dan $V_{x0} = 2,11\%$ untuk KLT-Bioautografi kontak dan $y = 16,594x + 1723,5$ dengan nilai $r = 0,9990$, $R^2 = 0,9982$ dan $V_{x0} = 1,98\%$ untuk KLT-Densitometri. Persamaan garis regresi dinyatakan linier bila nilai $r \geq 0,999$, sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat korelasi yang linier antara konsentrasi larutan standar streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat dengan diameter zona hambat (KLT-Bioautografi kontak) dan area puncak (KLT-Densitometri).

Uji akurasi dengan cara adisi standar ke dalam matriks ikan lele dan ikan nila masing-masing ditambahkan 3 macam konsentrasi streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat yang berbeda, maka diperoleh rekoverti dengan KLT-Bioautografi kontak masing-masing $99,72 \pm 0,83\%$ dan $99,29 \pm 0,49\%$ untuk ikan lele dan ikan nila. Rekoverti streptomisin sulfat dengan KLT-Densitometri menggunakan ninhydrin 1 % b/v dalam etanol sebagai penampak noda, kemudian dipindai dengan densitometri pada panjang gelombang maksimum 400 nm masing-masing $28,67 \pm 19,36\%$ dan $40,73 \pm 19,36\%$ untuk ikan lele dan ikan nila. Nilai rekoverti streptomisin sulfat dengan KLT-Bioautografi kontak memenuhi kriteria batas penerimaan akurasi untuk sampel dengan kadar $> 0,01\%$, yaitu 85-110 %. Nilai rekoverti streptomisin sulfat menggunakan metode KLT-Densitometri tidak memenuhi kriteria batas penerimaan akurasi. Hal ini disebabkan oleh struktur streptomisin sulfat yang lebih dominan oleh gugus amin sekunder sehingga streptomisin sulfat memiliki kemampuan penyerapan yang rendah karena adanya 5 gugus amin sekunder (NH) yang menyebabkan konjugasi elektronnya terganggu.

Pada penetapan rekoveri kanamisin sulfat dengan penambahan 3 macam konsentrasi yang berbeda diperoleh rekoveri dengan KLT-Bioautografi kontak $99,76 \pm 1,62$ % dan $98,22 \pm 2,68$ % masing-masing untuk ikan lele dan ikan nila. Rekoveri kanamisin sulfat dengan KLT-Densitometri sebesar $96,18 \pm 3,88$ % dan $95,86 \pm 5,35$ % masing-masing untuk ikan lele dan ikan nila. Nilai rekoveri kanamisin sulfat menggunakan kedua metode tersebut memenuhi kriteria batas penerimaan akurasi untuk sampel dengan kadar $> 0,01$ %, yaitu 85-110 %.

Setelah semua parameter validasi dilakukan pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa metode KLT-Bioautografi kontak dan KLT-Densitometri untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat telah memenuhi persyaratan validasi yang wajib dilakukan untuk uji batas, yaitu selektifitas dan batas deteksi. Berdasarkan data hasil uji batas deteksi, maka dapat disimpulkan bahwa KLT-Densitometri lebih sensitif dibanding KLT-Bioautografi kontak.

ABSTRACT

**Validation of TLC-Contact Bioautography and TLC-Densitometry
for Simultaneous Limit Test of
Streptomycin Sulfate and Kanamycin Sulfate Residues in
Catfish (*Clarias batrachus*) and Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

Background: Abuse of streptomycin sulfate and kanamycin sulfate as an anti-infection agents in animal feed can leave residues in animal tissues and cause allergic reactions in humans. An important impact of antibiotic residues is antibiotic resistance. The aim of this study was to obtain a valid and sensitive method for limit test of streptomycin sulfate and kanamycin sulfate simultaneously in fish meat. **Methods:** Optimum mobile phase was 10 % KH_2PO_4 . TLC-contact bioautography used *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 as a test organism. For TLC-densitometry, analyte spots were detected using ninhydrin 1 % w/v in ethanol and scanned at 400 nm. **Results:** The result of LOD from the TLC-Contact bioautography method for streptomycin sulfate and kanamycin sulfate were obtained 0.7028 μg and 0.8032 μg , respectively. Meanwhile, LOD of the TLC-densitometry method for streptomycin sulfate and kanamycin sulfate were obtained 0.0631 μg and 0.0685 μg , respectively. In this study, TLC-densitometry method showed better LOD than TLC-contact bioautography. **Conclusion:** TLC-densitometry appears a good choice for limit test of streptomycin sulfate and kanamycin sulfate simultaneously in fresh fish meat.

Keywords: TLC-Contact Bioautography, TLC-Densitometry, Streptomycin Sulfate, Kanamycin Sulfate, Antibiotic Residues