

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pada tahun 2014 budidaya perikanan Indonesia mencapai 20,8 juta ton dibandingkan tahun 2013 sebesar 19,4 juta ton. Jenis budidaya yang berkontribusi terbesar adalah budidaya ikan air tawar yang mencapai 28,2 % dari total jenis budidaya perikanan di Indonesia. Budidaya ikan air tawar di Indonesia merupakan sektor usaha yang sangat potensial sehingga berperan untuk memenuhi kebutuhan protein manusia (Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia, 2015).

Jenis ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia, yaitu ikan lele (*Clarias batrachus*) dan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Ikan lele dan ikan nila merupakan spesies ikan air tawar yang memiliki potensi pasar yang terus meningkat. Data Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Republik Indonesia tahun 2011 menyatakan bahwa produksi perikanan budidaya kolam didominasi oleh ikan lele sebesar 330.865 ton dan ikan nila sebesar 277.517 ton (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Republik Indonesia, 2011).

Penyakit akibat infeksi bakteri telah banyak ditemukan pada budidaya perikanan di Indonesia. Supriyadi *et al.* (2005) telah melakukan penelitian keragaman penyakit akibat infeksi bakteri pada ikan nila yang didominasi oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan *Streptococcus* sp. Bakteri *Aeromonas hydrophila* telah banyak menimbulkan kerugian pada budidaya ikan lele.

Berbagai macam antibiotika telah banyak digunakan untuk pengobatan dan pencegahan penyakit pada ikan budidaya, seperti streptomisin dan kanamisin. Streptomisin digunakan di tempat penetasan telur ikan sebagai perawatan jangka panjang, sedangkan kanamisin digunakan untuk mengobati infeksi kulit pada ikan (Supriyadi dan Rukyani, 2000; Kuncoro, 2004). *The European Agency for The Evaluation of Medical Products* tidak mengizinkan streptomisin dan kanamisin digunakan untuk mengobati dan mencegah penyakit pada ikan budidaya.

Penyalahgunaan streptomisin dan kanamisin dapat meninggalkan residu pada ikan sehingga menyebabkan reaksi alergi pada manusia. Dampak penting dari residu antibiotika adalah resistensi antibiotik. Penyebaran bakteri yang resisten terhadap antibiotika kepada manusia melalui rantai makanan yang disebabkan oleh konsumsi makanan yang terkontaminasi antibiotika. Banyak orang meninggal karena infeksi bakteri yang kebal antibiotika sehingga resistensi antibiotik menjadi ancaman bagi kesehatan manusia (Bacanlı dan Başaran, 2019).

Beberapa tahun terakhir, resistensi antibiotik telah menjadi salah satu bidang prioritas otoritas hukum. Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia (2015) menyatakan produk perikanan harus bebas dari residu obat, bahan kimia, bahan biologis dan kontaminan lainnya. Badan Standardisasi Nasional Indonesia menetapkan batas maksimum residu streptomisin dalam daging sebesar 0,1 µg/g (SNI, 2000). *The European Agency for The Evaluation of Medical Products* menetapkan batas residu maksimum kanamisin dalam daging sebesar 0,1 µg/g (Jin *et al.*, 2006). Oleh karena itu, diperlukan metode yang valid dan sensitif untuk mendeteksi residu antibiotika dalam jaringan hewan (M. Choma *et al.*, 2012).

Beberapa metode telah dilakukan untuk mendeteksi residu streptomisin dalam berbagai jaringan hewan, yaitu LC-MS dengan batas deteksi 0,025 µg dan rekoverti 78-101 % (Tao *et al.*, 2012; Santos dan Ramos, 2016) dan kromatografi gas dengan batas deteksi 0,005 µg dan rekoverti 81 % (Stead, 2000).

Adapun metode yang digunakan untuk mendeteksi residu kanamisin dalam berbagai jaringan hewan, yaitu ELISA dengan batas deteksi 0,05 µg dan rekoverti 85 % (Chen *et al.*, 2008) dan HPLC menggunakan detektor UV dengan batas deteksi 0,03 µg dan rekoverti 86,8 % (Chen *et al.*, 2009).

Namun beberapa metode di atas masih memiliki beberapa kelemahan, yaitu membutuhkan laboratorium yang memadai, proses derivatisasi senyawa antibiotika berlangsung beberapa jam dan tidak praktis untuk analisis secara simultan (Jiang *et al.*, 2019). Oleh karena itu, sangat penting untuk mengembangkan metode sederhana, valid dan sensitif untuk mendeteksi residu streptomisin dan kanamisin secara simultan.

British Pharmacopoeia telah menetapkan penggunaan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk identifikasi streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat dalam bahan baku dengan penampak noda 0,2% 1,3-dihidroksinaftalen dalam alkohol (British Pharmacopoeia Commission, 2018). KLT memiliki beberapa kelebihan, yaitu sederhana, waktu analisis yang singkat dan praktis untuk analisis beberapa analit secara simultan (Reich dan Maire-Widmer, 2013). KLT bila dikombinasikan dengan metode deteksi biologis dan kimia merupakan teknik yang efektif untuk analisis antibiotika dalam sampel kompleks (Bayona, 2019), seperti KLT-Bioautografi dan KLT-Densitometri.

KLT-Bioautografi merupakan metode yang sensitif untuk mendeteksi aktivitas senyawa antibiotika (Patil *et al.*, 2013). Berbagai teknik bioautografi seperti bioautografi langsung, bioautografi imersi dan bioautografi kontak telah banyak digunakan untuk mendeteksi senyawa antibiotika. Pada KLT-Bioautografi langsung dan imersi, media cair yang telah berisi bakteri disemprot atau dituang langsung pada lempeng KLT yang menyebabkan bakteri tidak dapat tumbuh secara maksimal dan merata sehingga teknik ini memiliki sensitifitas rendah. Sedangkan pada KLT-Bioautografi kontak, lempeng KLT diletakkan diatas media padat yang telah diinokulasikan bakteri sehingga terjadi difusi senyawa antibiotik dari lempeng KLT ke media agar yang telah diinokulasi bakteri uji (Marston, 2011). Isnaeni (*in process* 2020) telah melakukan penelitian tentang KLT-Bioautografi kontak untuk mendeteksi streptomisin sulfat dalam udang berdasarkan aktivitas streptomisin sulfat yang menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ATCC 8739 dengan batas deteksi 0,30 µg dan rekoverti 86,93 %.

KLT-Densitometri merupakan metode analisis yang sensitif dan spesifik (Reich dan Maire-Widmer, 2013). Hubicka *et al.* (2009) telah melakukan penelitian menggunakan KLT-Densitometri untuk menganalisis kanamisin dalam produk farmasi. Hasil yang diperoleh memiliki sensitivitas tinggi dengan batas deteksi sebesar 0,25 µg dan rekoverti 100,23 %. Uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam sampel ikan menggunakan metode KLT-Bioautografi kontak dan KLT-Densitometri dengan penampak noda ninhidrin belum pernah dilaporkan sebelumnya.

Metode analisis residu dengan konsentrasi analit yang rendah dalam matriks kompleks masih menjadi tantangan dalam mencapai batas deteksi yang rendah. Jenis ikan air tawar seperti ikan lele dan ikan nila memiliki kadar protein yang tinggi. Streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat sangat terikat pada protein karena pembentukan kompleks kation-anion yang tidak larut sehingga teknik ekstraksi streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat dari protein berperan penting dalam analisis multiresidu antibiotika (Diez *et al.*, 2015).

Teknik yang biasa digunakan untuk pemisahan antibiotika dari matriks kompleks, yaitu presipitasi protein. Presipitasi protein merupakan teknik ekstraksi sederhana, waktu ekstraksi yang singkat dan efektif untuk pengendapan protein TCA dalam jaringan hewan yang kompleks (McGlinchey *et al.*, 2008). Ekstraksi streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat dari sampel ikan membutuhkan pH rendah untuk memfasilitasi pelepasan antibiotika tersebut dari protein. Biasanya pH ini dicapai dengan menggunakan larutan asam kuat, seperti TCA 5 % dalam campuran air, tetapi rekoverti analit yang diperoleh < 30 % (Tao *et al.*, 2012; Zarei *et al.*, 2014; Diez *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* (2016) menunjukkan bahwa pengendapan protein menggunakan TCA 20 % memperoleh rekoverti analit terbaik dan tidak ada peningkatan rekoverti yang signifikan ketika konsentrasi TCA lebih tinggi dari 20%.

Berdasarkan uraian diatas, metode KLT-Bioautografi kontak dan KLT-Densitometri mampu mendeteksi residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat dalam sampel ikan lele dan ikan nila secara simultan. Pada penelitian ini dilakukan tahap preparasi sampel menggunakan larutan ekstraksi TCA 20 % dalam campuran

air. Metode analisis divalidasi untuk memperoleh parameter kinerja yang diperlukan. Adapun parameter yang divalidasi antara lain selektifitas, batas deteksi, batas kuantitasi, presisi, akurasi, linieritas dan rentang. Penggolongan kategori uji validasi berdasarkan USP (2018) untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat termasuk dalam kategori dua yang harus divalidasi adalah selektifitas dan batas deteksi. Meskipun demikian, pada penelitian ini juga dilakukan uji linieritas dan uji akurasi sebagai penunjang penelitian. Uji linieritas dan uji akurasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan metode yang digunakan pada rentang konsentrasi yang diukur memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dan untuk mengetahui kemampuan metode analisis memperoleh nilai konsentrasi sebenarnya setelah dilakukan secara berulang-ulang.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah metode KLT-Bioautografi kontak untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila memenuhi parameter persyaratan validasi metode yang meliputi selektifitas, batas deteksi, linieritas dan akurasi?
2. Apakah metode KLT-Densitometri untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila memenuhi parameter persyaratan validasi metode yang meliputi selektifitas, batas deteksi, linieritas dan akurasi?
3. Metode analisis manakah yang paling sensitif untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

Memperoleh metode analisis yang valid dan sensitif untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menentukan nilai parameter validasi metode yang meliputi selektifitas, batas deteksi, linieritas dan akurasi untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila menggunakan metode KLT-Bioautografi kontak.
2. Menentukan nilai parameter validasi metode yang meliputi selektifitas, batas deteksi, linieritas dan akurasi untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila menggunakan metode KLT-Densitometri.
3. Menentukan metode analisis yang paling sensitif untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila.

1.4. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan metode yang valid dan sensitif untuk uji batas residu streptomisin sulfat dan kanamisin sulfat secara simultan dalam ikan lele dan ikan nila.