

TESIS

**OPTIMASI DAN VALIDASI
METODE ANALISIS METABOLIT NITROFURAN
DALAM PANGAN OLAHAN UDANG
SECARA KCKT-UV/PDA**



Oleh

RACHMA AYUNINGTYAS

NIM 051714153016

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2020

TESIS

**OPTIMASI DAN VALIDASI
METODE ANALISIS METABOLIT NITROFURAN
DALAM PANGAN OLAHAN UDANG
SECARA KCKT-UV/PDA**

Oleh :

RACHMA AYUNINGTYAS

NIM 051714153016

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2020

TESIS

**OPTIMASI DAN VALIDASI
METODE ANALISIS METABOLIT NITROFURAN
DALAM PANGAN OLAHAN UDANG
SECARA KCKT-UV/PDA**

Untuk Memenuhi Syarat Memperoleh Gelar
Magister dalam Program Magister Program Studi
Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas
Airlangga

Oleh :

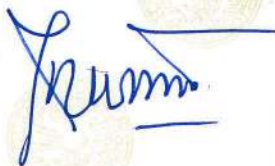
RACHMA AYUNINGTYAS
NIM 051714153016

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 02 SEPTEMBER 2020**

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. rer. nat. H.M. Yuwono, MS., Apt.
NIP. 196005051986011003


Pembimbing Serta



Dr. Riesta Primaharinastiti, MSi., Apt.
NIP. 197204181997032001

Mengetahui,

**Koordinator Program Magister
Program Studi Ilmu Farmasi**



Prof. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS., Apt.
NIP. 195612171985031004

Halaman Penetapan Panitia Penguji

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh Panitia Penguji
pada Program Studi Magister Program Studi Ilmu
Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
pada Tanggal : 02 September 2020

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Sugijanto, MS., Apt.

Anggota : 1. Prof. Dr. rer. nat. H.M. Yuwono, MS., Apt.

2. Dr. Riesta Primaharinastiti, MSi., Apt.

3. Dr. Asri Darmawati, MS., Apt.

4. Drs. Marcellino Rudyanto, Apt., M.Si., Ph.D

PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rachma Ayuningtyas

NIM : 051714153016

Program Studi : Magister Ilmu Farmasi

Judul Tesis : OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS
METABOLIT NITROFURAN DALAM PANGAN OLAHAN
UDANG SECARA KCKT-UV/PDA

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiarisme) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik. Pada tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan di dalam daftar pustaka. Demikian, pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak manapun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 02 September 2020

Yang membuat pernyataan,


Rachma Ayuningtyas

NIM. 051714153016

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis yang berjudul **“OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS METABOLIT NITROFURAN DALAM PANGAN OLAHAN UDANG SECARA KCKT-UV/PDA”** ini dapat diselesaikan.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih S.E., M.T., Ak., CMA., yang telah memberi kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di Universitas Airlangga.
2. Dekan Fakultas Farmasi, Prof. Dr. H. Umi Athiyah, MS., Apt., yang telah memberi kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
3. Koordinator Program Studi Magister Ilmu Farmasi, Prof. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS., Apt., dan Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Farmasi Drs. Hadi Poerwono, MSc., Ph.D., Apt., atas kesempatan dan fasilitas selama masa pembelajaran di S2 Ilmu Farmasi.
4. Drs. Marcellino Rudyanto, MSc., Ph.D., Apt., selaku dosen wali sekaligus dosen penguji tesis, yang telah memberikan bimbingan selama penulis menjalani pendidikan di peminatan Analisis Farmasi.
5. Prof. Dr. rer. nat. H. M. Yuwono, MS., Apt., selaku pembimbing utama dan Dr. Riesta Primaharinastiti, MSi., Apt., selaku pembimbing serta yang telah memberikan dorongan, bimbingan, serta saran dari awal penelitian hingga tesis ini diselesaikan.

6. Prof. Dr. Sugijanto, MS., Apt., dan Dr. Asri Darmawati, MS., Apt., selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dan masukan pada penulisan tesis ini.
7. Badan Pengawas Obat dan Makanan yang telah membiayai dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan tugas belajar di Universitas Airlangga.
8. Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan di Surabaya yang telah meminjamkan sarana dan prasarana selama penulis mengerjakan penelitian tesis, serta memberikan dukungan moral selama masa tugas belajar.
9. Semua teman yang telah berperan sebagai rekan diskusi, berbagi semangat serta dukungan selama masa tugas belajar ini.
10. Suami penulis, Ahmad Surya Darma, yang telah mendampingi penulis dengan penuh kesabaran; ananda tersayang Asma dan Zakki, yang selalu memberikan kebahagiaan untuk penulis.
11. Ayahanda Sugiyartono dan ibunda Hanoem Eka Hidajati yang turut memberikan masukan selama penulis menjalani pendidikan ini; ayah Asfa Harir dan ibu Nadhifah, serta keluarga besar yang selalu mendoakan hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata penulis mohon maaf yang sebesar-besarnya apabila ada ketidaksempurnaan dalam penyusunan tesis ini. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu kefarmasian.

Surabaya, September 2020

Penulis

RINGKASAN**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS
METABOLIT NITROFURAN DALAM PANGAN OLAHAN UDANG
SECARA KCKT-UV/PDA**

Nitrofurans adalah golongan antibiotik yang seringkali digunakan sebagai bahan tambahan pakan pada budidaya udang, dan masih banyak disalahgunakan. Sehingga diperlukan adanya pengawasan terhadap produk-produk dengan komposisi utama udang. Beberapa obat golongan nitrofurans yang umum digunakan adalah furazolidon, furaltadon, dan nitrofurantoin. Golongan ini dimetabolisme secara cepat dalam tubuh hewan dan umumnya tidak muncul sebagai residu, sehingga menyulitkan deteksinya dalam produk makanan yang berasal dari hewan. Ketiga senyawa nitrofurans tersebut mampu membentuk metabolit toksik, yaitu 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) untuk furazolidon, 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ) untuk furaltadon, dan 1-aminohydantoin (AHD) untuk nitrofurantoin. Metabolit ini dapat terikat di jaringan dan stabil untuk waktu yang lama, sehingga berfungsi sebagai penanda untuk penggunaan nitrofurans secara ilegal pada hewan penghasil makanan.

Metode yang telah digunakan untuk analisis kadar metabolit nitrofurans adalah *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Karena sifatnya yang menggunakan antibodi yang spesifik untuk analit target, metode ini tidak dapat digunakan untuk melakukan penetapan kadar beberapa analit secara simultan.

Metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor tandem spektrometri massasemakin banyak digunakan dan telah secara signifikan meningkatkan metode kuantitatif untuk penentuan nitrofurans dalam beberapa tahun terakhir. Metode LC-MS/MS memiliki selektivitas dan sensitivitas yang sangat tinggi, namun aplikasinya masih sangat mahal dan tidak semua laboratorium pengujian memiliki instrumen ini. Untuk keperluan kontrol kualitas secara rutin terhadap sampel produk pangan yang jumlahnya cukup banyak, maka diperlukan suatu metode skrining sebagai metode awal sebelum dilakukan metode LC-MS/MS. Dengan demikian LC-MS/MS lebih ditujukan untuk keperluan konfirmasi terhadap sampel yang dinyatakan positif pada hasil metode skrining.

Metode lain yang digunakan untuk penentuan kadar metabolit nitrofurans adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor UV-PDA atau UV, antara lain analisis AOZ pada hati dan otot dada ayam. Namun sejauh ini belum tersedia metode yang sudah tervalidasi untuk penentuan kadar metabolit nitrofurans pada pangan olahan yang berbahan dasar udang. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan validasi metode KCKT dengan detektor UV-PDA sebagai metode awal untuk identifikasi dan penetapan kadar residu metabolit nitrofurans dalam pangan olahan udang.

Sampel pangan olahan udang yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakso udang yang dibuat sendiri, dengan cara pembuatan sesuai pada pustaka. Tidak terdapat cemaran analit pada sampel yang digunakan, hal ini ditunjukkan dari tidak adanya puncak-puncak analit pada kromatogram matriks sampel.

Tahapan awal validasi metode adalah optimasi cara ekstraksi dan kondisi KCKT. Diperoleh hasil optimal dengan ekstraksi menggunakan etil asetat dan n-heksana, dengan kondisi KCKT fase gerak ammonium asetat 20 mM : metanol (70:30), laju

alir 0,5 ml/menit, volume injeksi 100 μ L dan suhu kolom 40°C, detektor UV pada panjang gelombang 260 nm.

Tahap selanjutnya adalah melakukan uji kesesuaian sistem, untuk memastikan bahwa sistem yang digunakan dapat menyediakan hasil yang memenuhi kriteria. Diperoleh hasil RSD waktu resolusi untuk AOZ, AMOZ, dan AHD masing-masing adalah 0,08%; 0,11%; dan 0,08%. Sedangkan hasil RSD untuk area AOZ, AMOZ, dan AHD masing-masing adalah 1,71%; 0,32%; dan 0,28%. Syarat keterulangan yang baik adalah $RSD \leq 1\%$, sehingga disimpulkan bahwa seluruh analit memenuhi syarat kecuali AOZ.

Setelah melakukan optimasi metode dan uji kesesuaian sistem, maka dilakukan validasi metode. Langkah pertama dalam validasi metode adalah uji selektivitas, yaitu menyuntikkan larutan baku campuran dalam matriks sampel. Puncak ketiga analit harus terpisah satu sama lain dengan baik dan terpisah dari puncak-puncak lain dalam matriks. Suatu metode dikatakan selektif apabila resolusinya > 2 . Hasil resolusi yang diperoleh adalah AOZ 12,62; AMOZ 3,31; AHD 4,28. Selain itu juga dilakukan penghitungan *Similarity Index* (SI) dimana untuk AOZ dan AHD diperoleh hasil 0,987087 dan 0,988885. Sedangkan untuk AMOZ, nilai SI adalah 0,877971.

Uji linieritas untuk AOZ pada rentang 50,19-100,39 ng/mL memperoleh hasil persamaan regresi linear $y = 438,23x + 5111,82$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,9759 dan t hitung = 8,9432. Linieritas AMOZ pada rentang 51,12-102,23 ng/mL memperoleh hasil persamaan regresi linear $y = 398,58x - 2023,68$; $r = 0,9869$ dan t hitung = 12,2412. Linieritas AHD pada rentang 49,78-99,57 ng/mL memperoleh hasil persamaan regresi linear $y = 329,28x + 12990,65$; $r = 0,9620$ dan t hitung = 7,0441. Nilai r dan t yang didapat kemudian dibandingkan dengan nilai r tabel dan t tabel, yaitu masing-masing 0,8114 dan 2,7764 ($DF=4$, $\alpha=0,05$). Nilai r hitung dan t hitung lebih besar daripada r tabel dan t tabel, artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi dan area. Untuk memverifikasi apakah model terbaik untuk menggambarkan hubungan variabel x (konsentrasi) dan y (area) adalah garis lurus (regresi linier) atau apakah hubungan antara dua variabel tersebut lebih baik digambarkan dengan suatu kurva, dilakukan uji Mandel yaitu dengan menghitung nilai \hat{F} . Nilai \hat{F} tersebut kemudian dibandingkan dengan nilai F tabel. Nilai \hat{F} untuk AOZ, AMOZ, dan AHD masing-masing adalah 0,47; 0,58; dan 8,52, sedangkan nilai F tabel ($P=99\%$, $df_1 = 1$, $df_2 = n-3$) yaitu 34,12. Nilai \hat{F} dari ketiga analit lebih kecil daripada F tabel, sehingga dapat disimpulkan linieritas ketiganya dapat diterima.

Akurasi dinyatakan dalam persen rekoveri, yaitu perolehan kembali dari sejumlah larutan baku yang diketahui konsentrasinya. Pada konsentrasi 60, 80 dan 100 ng/mL, rekoveri AOZ adalah 79,82% \pm 15,98 - 103,99% \pm 13,03; rekoveri AMOZ 79,86% \pm 15,56 - 100,68% \pm 4,12; dan rekoveri AHD adalah 89,70% \pm 4,98 - 103,62% \pm 14,90. Syarat keberterimaan uji akurasi adalah 60-115%, sehingga disimpulkan hasil uji akurasi memenuhi syarat.

Uji presisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah *repeatability*, yaitu analisis dengan replikasi tiga kali secara independen dari tiga konsentrasi sampel seperti pada uji akurasi. Hasil RSD untuk AOZ adalah 6,12-20,02%; RSD AMOZ 4,15-19,48%; dan RSD untuk AHD adalah 3,30-14,38%. Sedangkan syarat presisi untuk analit dengan kadar 10-100 ppb adalah $RSD < 21\%$. Dengan demikian metode ini memenuhi syarat presisi.

LOD dan LOQ ditentukan dengan cara menghitung rasio *signal-to-noise* dari hasil penyuntikan baku yang konsentrasinya lebih rendah daripada larutan baku terkecil pada uji linearitas. Konsentrasi yang digunakan adalah AOZ 41,52 ng/mL,

AMOZ 45,06 ng/mL dan AHD 39,94 ng/mL. LOD serta LOQ yang diperoleh untuk AOZ adalah 3,09 ng/mL dan 10,29 ng/mL; AMOZ 6,84 ng/mL dan 22,82 ng/mL; AHD 4,61 ng/mL dan 15,36 ng/mL.

Dari analisis AOZ, AMOZ dan AHD dalam pangan olahan udang secara KCKT UV-PDA dengan kolom ODS 4,6x250 mm 5 μ m, fase gerak ammonium asetat 20 mM:asetonitril (70:30), laju alir 0,5 ml/menit, suhu kolom 40°C dan detektor UV 260 nm disimpulkan bahwa metode ini memenuhi persyaratan validasi serta dapat digunakan sebagai metode skrining awal untuk cemaran metabolit nitrofuran dalam produk olahan udang.