

SKRIPSI

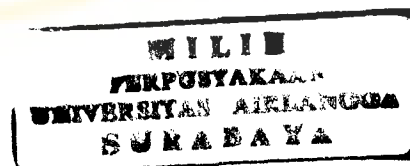
LEVI PURADEWA

VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU ANTIBIOTIKA OKSITETRASIKLIN DAN TETRASIKLIN PADA UDANG SECARA *HPLC*

F7 53/06
Pur
v



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2005



LEMBAR PENGESAHAN

**VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU
ANTIBIOTIKA OKSITETRASIKLIN DAN
TETRASIKLIN PADA UDANG SECARA *HPLC***

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Universitas Airlangga**

2005

Oleh :

**LEVI PURADEWA
NIM : 059912186**

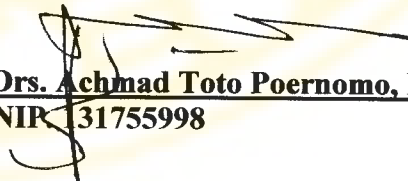
skripsi ini telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama



**Dr. rer.nat. H. Mohammad Yuwono, MS
NIP.131569384**

Pembimbing Serta



**Drs. Achmad Toto Poernomo, M.S
NIP.131755998**

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur bagi Allah Bapa, Tuhan Yesus, dan Roh Kudus yang senantiasa menyertai, mengingatkan, dan membimbing kami dalam segala hal yang kami kerjakan terutama dalam penyelesaian skripsi ini sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

Dengan terselesaikannya skripsi dengan judul **"Validasi Metode Analisis Residu Antibiotika Oksitetrasiklin Dan Tetrasiklin Pada Udang Secara HPLC"** maka pada kesempatan ini kami menyampaikan terimakasih kepada :

1. Dr. rer. nat. H. Mochammad Yuwono, MS dan Drs. Achmad Toto Poernomo, M,Si, Apt, selaku dosen pembimbing atas dukungan dan bimbingannya untuk penyelesaian skripsi ini.
2. Prof. Dr. Siswandono, Ms, Apt dan Dr. Hadi Siswono, Apt, selaku dosen penguji yang telah memberi dukungan, saran dan kritik kepada kami.
3. Prof. Dr. Noor Cholish Zaini, Apt, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan program sarjana.
4. Dr. rer. nat. H. Mochammad Yuwono, MS, selaku dosen wali, atas dorongannya dan bimbingan akademik yang telah diberikan.
5. Para dosen yang selalu sabar dalam mendidik dan mengajarkan ilmu pengetahuan sehingga kami dapat menyelesaikan pendidikan sarjana.
6. Papa (Alm.), Mama, Mas Indra, Mbak Lia, Mbak Liris semua keluargaku yang kusayangi yang terus berdoa agar kami cepat lulus dan selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan pendidikan sarjana.
7. Kepala dan staff karyawan Multipurpose Laboratory atas bantuan selama pengerjaan penelitian.
8. Mas Gunarso, Roy, mbak Evi, mbak Yuyun, dan mbak Yanti, atas bantuan ilmu pengetahuan, waktu dan tenaga selama penelitian.
9. Buck-T dan Pak Catur yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini buat foto dan scannernya.
10. Teman-teman Angkatan'99, FLOS (Andi, Mahardian, Arianto, Tito) thanks buat persahabatan yang indah dalam hidup ini.

11. Buat Glens Juliet terimakasih atas bantuannya, dorongan semangat dan menjadi tempat segala keluh kesahku, kamu adalah yang terbaik buatku.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan, saran dan kritik sampai terselesaikannya penelitian dan skripsi ini.

Semoga Allah Bapa di surga senantiasa melimpahkan berkat-Nya atas budi baik yang telah diberikan.

Akhir kata, kami berharap agar penelitian ini dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang kefarmasian dan dapat bermanfaat bagi masyarakat, serta mendorong pihak lain khususnya rekan-rekan mahasiswa untuk menyempurnakan penelitian ini.

Surabaya, Mei 2005

Penyusun

RINGKASAN

**VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU ANTIBIOTIKA
OKSITETRASIKLIN DAN TETRASIKLIN PADA UDANG SECARA
HPLC**

Levi Puradewa

Oksitetrasiklin dan tetrasiklin termasuk salah satu antibiotika yang digunakan yang digunakan pada budidaya udang. Timbulnya residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin disebabkan oleh penggunaan antibiotik tersebut dalam pakan udang, selain itu juga disebabkan oleh penggunaan oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada pencegahan dan pengobatan penyakit.

The European Agency for The Evaluation of Medicinal Products memberikan persyaratan bahwa maksimum residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang diperbolehkan ada pada udang adalah 0.1 µg/mL. Oleh sebab itu perlu dilakukan validasi metode analisis residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang.

Untuk preparasi sampel udang dilakukan dengan dua cara yaitu, pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE*. KLT-Preparatif dilakukan dengan menotolkan sampel udang pada lempeng KLT-Preparatif yang kemudian dielusi, sedangkan untuk *SPE* proses pemisahan dilakukan dengan memsukan sampel pada alat *SPE* kemudian mengelusi sampel tersebut dengan metanol, tampungan metanol selanjutnya dianalisis dengan *HPLC*.

Validasi metode analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang secara *HPLC* didahului dengan proses optimasi kondisi *HPLC* dan optimasi eluen KLT-Preparatif. Optimasi kondisi *HPLC* dilakukan untuk mendapatkan puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang terpisah dan terpisah dengan komponen lain yang berasal dari metanol maupun sampel udang. Kondisi optimum *HPLC* untuk pemisahan oksitetrasiklin dengan tetrasiklin maupun dengan komponen lain dalam sampel dengan menggunakan kolom Hypersil BDS C-18 5µm, 4,6mm x 250mm, fase gerak metanol : asetonitril : asam oksalat 0,01M(pH=2,5) = 5 : 15 : 80 (v/v/v), aliran 1,0 mL/menit, dan dengan detektor *diode-array*, dengan mode isokratis. Optimasi eluen KLT-Preparatif dilakukan untuk menentukan eluen yang dapat memisahkan noda oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan komponen lain dalam udang digunakan metanol : asetonitril = 4 : 1, setelah lempeng KLT-Preparatif diimpregnasi dengan 5% larutan EDTA.

Dari hasil uji secara kualitatif maupun kuantitatif didapatkan harga parameter validasi sebagai berikut: koefisien korelasi (r) untuk oksitetrasiklin = 0,99919 dengan rentang konsentrasi 0,514 – 5,140 µg/mL sedangkan untuk tetrasiklin (r) = 0,99913 dengan rentang konsentrasi 0,514 – 5,145 µg/mL. Faktor selektivitas antara oksitetrasiklin dengan komponen lain (α) = 1,91, derajat keterpisahan (R_s) = 3,10 sedangkan faktor selektivitas antara oksitetrasiklin dan tetrasiklin (α) = 1,16, derajat keterpisahan (R_s) = 1,65. Batas deteksi untuk oksitetrasiklin (LOD) = 0,19 µg/mL, batas kuantitasi (LOQ) = 0,65 µg/mL, sedangkan batas deteksi untuk tetrasiklin (LOD) = 0,13 µg/mL, batas kuantitasi

ABSTRACT

The high performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline and tetracycline used in shrimp has been developed. The extraction and clean-up were performed by using either TLC treated EDTA with methanol : acetonitrile (4:1) as mobile phase or SPE (Solid Phase Extraction) with methanol as mobile phase. The extract containing oxytetracycline and tetracycline was examined by HPLC using Hypersil BDS 5 μm , 250 mm x 4,6 mm column and a mobile phase of methanol : acetonitrile : 10mM oxalic acid (pH 2.5) = 5 : 15 : 80 (v/v/v). The mobile phase flow rate was 1.0mL min^{-1} , and UV detection is performed at 365 nm with a photo-diode array detector. The average recoveries of 100 g blank samples spiked with 5 mg of standards cleaned up with preparative TLC were 0.38% (CV = 0.05%, n = 4) for oxytetracycline and 0.92% (CV = 0.01%, n = 4) for tetracycline ; whilst the average recoveries of 20 g blank samples spiked with 0.1 mg of standards and clean-up with SPE method were 46.25% (CV = 1.99%, n = 4) for oxytetracycline and 69.92% (CV = 1.92%, n = 4) for tetracycline. The limit of detection was 0.19 $\mu\text{g/mL}$ and 0.13 $\mu\text{g/mL}$ for oxytetracycline and tetracycline, respectively. The limit of quantitation for oxytetracycline was 0.65 $\mu\text{g/mL}$ whereas 0.43 $\mu\text{g/mL}$ for tetracycline.

Keywords: Oxytetracycline, tetracycline, shrimps, HPLC, method validation.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Permasalahan	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Tentang Antibiotika	5
2.2 Tinjauan Tentang Oksitetrasiklin	5
2.2.1 Sifat Fisika Kimia Oksitetrasiklin	5
2.2.2 Rumus Bangun Oksitetrasiklin	6
2.3 Tinjauan Tentang Tetrasiklin	6
2.3.1 Sifat Fisika dan Kimia Tetrasiklin	6
2.3.2 Rumus Bangun Tetrasiklin	7
2.4 Toksisitas Golongan Tetrasiklin	7
2.5 Residu Antibiotik Dalam Udang	8
2.5.1 Terjadinya Residu Antibiotika	8
2.5.2 Batas Residu Antibiotika	8
2.5.3 Dampak Residu Antibotika	8
2.6 Tinjauan Tentang <i>HPLC</i>	8
2.6.1 Gerbang Suntik	9
2.6.2 Pompa Cairan	9
2.6.3 Oven Kolom	10
2.6.4 Kolom Fase Terbalik	10

2.6.5	Detektor <i>Diode-Array</i>	11
2.6.6	Instrumentasi <i>HPLC</i>	12
2.7	Parameter <i>HPLC</i>	13
2.7.1	Waktu Tambat (t_R)	13
2.7.2	Faktor Selektivitas (α)	14
2.7.3	Derajat Keterpisahan	14
2.8	Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis	14
2.8.1	Akurasi (Ketepatan)	14
2.8.2	Selektivitas	15
2.8.3	Presisi (Kecermatan)	15
2.8.4	Keterulangan	16
2.8.5	Sensitivitas	16
2.8.6	Linieritas	17
2.9	Tinjauan Metode Pemisahan	18
2.9.1	Kromatografi Lapis Tipis	18
2.9.2	<i>Solid Phase Extraction (SPE)</i>	19
2.10	Analisis Oksitetrasiklin dan Tetrasiklin Secara <i>HPLC</i>	20
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL		22
BAB IV METODE PENELITIAN		
4.1	Alat dan Bahan	23
4.1.1	Alat	23
4.1.2	Bahan	23
4.2	Optimasi Kondisi <i>HPLC</i>	24
4.2.1	Penentuan Panjang Gelombang	24
4.2.2	Pemilihan Kolom	24
4.2.3	Optimasi Kondisi <i>HPLC</i> (Pengaruh Sampel Ugang)	24
4.3	Validasi Metode	25
4.3.1	Pembuatan Larutan Baku	
	Campuran Oksitetrasiklin dan Tetrasiklin	25
4.3.2	Penentuan Selektivitas (α) dan Derajat Keterpisahan (R_s)	25
4.3.3	Penentuan Linieritas	25
4.3.4	Penentuan Batas Deteksi (<i>LOD</i>) dan Batas Kuantitasi (<i>LOQ</i>)	25

4.3.5 Penentuan Presisi (Kecermatan)	26
4.3.6 Penentuan Persen Perolehan Kembali (Akurasi) dan Presisi Metode	26
4.3.6.1 Pembuatan Larutan 0.1 M EDTA- <i>McIlvaine Buffer</i>	26
4.3.6.2 Penentuan Susut Pengeringan Ugang	26
4.3.6.3 Akurasi dan Presisi Metode Dengan Pemisahan Secara KLT-Preparatif	26
4.3.6.3.1 Pemilihan Eluen KLT	26
4.3.6.3.2 Akurasi dan Presisi Metode	27
4.3.6.4 Akurasi dan Presisi Metode Dengan Pemisahan Secara <i>SPE</i>	27
BAB V HASIL PENELITIAN	
5.1 Optimasi Kondisi <i>HPLC</i>	29
5.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Pengamatan	29
5.1.2 Pemilihan Kolom	30
5.1.3 Optimasi Kondisi <i>HPLC</i>	33
5.2 Validasi Metode	36
5.2.1 Selektivitas	36
5.2.2 Linieritas	39
5.2.3 Batas Deteksi (<i>LOD</i>) dan Batas Kuantitasi (<i>LOQ</i>)	41
5.2.4 Presisi (Kecermatan)	44
5.2.5 Akurasi Dan Presisi Metode	45
5.2.5.1 Penentuan Susut Pengeringan Ugang	45
5.2.5.2 Pemilihan Eluen KLT	46
5.2.5.3 Akurasi Dan Presisi	46
5.3 Analisis Data Statistik	49
BAB VI PEMBAHASAN	51
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
II.1 Analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang pernah dilakukan	21
II.2 Macam-macam eluen untuk KLT oksitetrasiklin dan tetrasiklin	21
V.1 Harga α dan R_s oksitetrasiklin dan tetrasiklin antara kolom Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm dan Hypersil ODS C-18 5 μm , 4,5mm x 150mm	33
V.2 Kondisi HPLC untuk analisa oksitetrasiklin dan tetrasiklin	36
V.3 Data faktor selektivitas (α) dan derajat keterpisahan (R_s) puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin dan komponen lain dalam sampel	37
V.4 Data hubungan antara kadar oksitetrasiklin dengan area oksitetrasiklin	39
V.5 Data hubungan antara kadar tetrasiklin dengan area tetrasiklin	39
V.6 Data hubungan antara kadar oksitetrasiklin dengan tinggi puncak oksitetrasiklin untuk penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	41
V.7 Data hubungan antara kadar tetrasiklin dengan tinggi puncak tetrasiklin untuk penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	42
V.8 Data harga N_p , p , dan S_b	43
V.9 Data hasil penentuan presisi oksitetrasiklin dengan kadar 2,06 $\mu\text{g/mL}$	44
V.10 Data hasil penentuan presisi tetrasiklin dengan kadar 2,06 $\mu\text{g/mL}$	45
V.11 Susut pengeringan udang	45
V.12 Hasil optimasi eluen KLT	46
V.13 Data hubungan antara konsentrasi oksitetrasiklin standar dengan area oksitetrasiklin untuk penentuan persen perolehan kembali	46
V.14 Data hubungan antara kadar tetrasiklin dengan area tetrasiklin untuk penentuan persen perolehan kembali	47
V.15 Akurasi dan presisi metode dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan <i>SPE</i> untuk oksitetrasiklin	48

V.16 Akurasi dan presisi metode dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan <i>SPE</i> untuk tetrasiklin	49
V.17 Data persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan <i>SPE</i>	49
V.18 Tabel hasil uji t persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang hasil preparasi dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan <i>SPE</i>	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Rumus bangun oksitetrasiklin	6
2.2 Rumus bangun tetrasiklin	7
2.3 Diagram alat pada <i>HPLC</i>	12
2.4. Kromatogram hasil analisis dengan <i>HPLC</i>	13
5.1 Spektrum 3D larutan campuran standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin	29
5.2 Spektra 3D metanol	30
5.3 Kromatogram larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan kolom Hypersil ODS C-18 5 μ m, 4,6mm x 150mm (t_R oksitetrasiklin = 3,761, t_R tetrasiklin = 4,306)	31
5.4 Kromatogram larutan baku oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan kolom Hypersil BDS C-18 5 μ m, 4,6mm x 250mm (t_R oksitetrasiklin = 6,615, t_R tetrasiklin = 7,629)	32
5.5 Kromatogram metanol	34
5.6 Kromatogram oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam pelarut metanol (t_R oksitetrasiklin = 6,615, t_R tetrasiklin = 7,629)	34
5.7 Kromatogram sampel udang (hasil ekstraksi) dalam pelarut metanol	35
5.8 Kromatogram sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin (t_R = 4,561) dan tetrasiklin (t_R = 7,616)	35
5.9 Kromatogram <i>HPLC</i> standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam sampel udang	37
5.10 Spektra antara oksitetrasiklin standar dan oksitetrasiklin dalam sampel udang	38
5.11 Spektra antara tetrasiklin standar dan tetrasiklin dalam sampel udang	38
5.12 Kurva persamaan garis regresi kadar oksitetrasiklin (μ g/mL) vs Area oksitetrasiklin (mAU*s)	40

5.13 Kurva persamaan garis regresi tetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs Area tetrasiklin (mAU*s)	40
5.14 Kurva persamaan garis regresi kadar oksitetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs tinggi puncak (mAU)	42
5.15 Kurva persamaan garis regresi kadar tetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs tinggi puncak (mAU)	43
5.16 Kurva dan persamaan garis regresi kadar oksitetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs Area oksitetrasiklin (mAU*s) untuk penentuan persen perolehan kembali	47
5.17 Kurva dan persamaan garis regresi kadar tetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs Area tetrasiklin (mAU*s) untuk penentuan persen perolehan kembali	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Selektivitas(α) Dan Derajat Keterpisahan (R_s)	60
Lampiran 2 Perhitungan Batas Deteksi (LOD) Dan Batas Kuantitasi(LOQ)	62
Lampiran 3 Perhitungan Presisi	64
Lampiran 4 Perhitungan Akurasi (Persen Perolehan Kembali)	66
Lampiran 5 Data Penentuan Akurasi Dan Presisi Metode	67
Lampiran 6 Data Hasil Penghitungan SPSS	69
Lampiran 7 COA Oksitetrasiklin	70
Lampiran 8 COA Tetrasiklin	71
Lampiran 9 Gambar Instrumen <i>HPLC</i>	72

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pada dua dekade terakhir, produksi udang mengalami pertumbuhan rata-rata 20%-30% per tahun dengan produsen terbesar adalah Jepang, USA, dan Eropa, sedang pengeksport terbesar adalah Taiwan, Thailand, Indonesia, dan Cina. Oleh karena itu diperlukan upaya untuk meningkatkan kualitas dari udang dan bahan makanan udang supaya ekspor udang mampu bersaing dengan negara lain. Upaya peternak udang untuk meningkatkan kualitas bahan makanan dari hewan ternak telah melibatkan penggunaan zat kimia, antara lain antibiotika (Anonim, 2002).

Pada saat ini, penggunaan antibiotika di bidang peternakan udang sudah demikian luas, yang dimaksudkan untuk tindakan pencegahan dan pengobatan terhadap suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Soetomo, 1990).

Disamping mempunyai kegunaan dan keuntungan tersebut di atas, penggunaan antibiotika yang terus-menerus dan tidak tepat ternyata dapat meninggalkan residu di dalam jaringan atau produk lain dari peternakan terutama udang. Residu tersebut bila dikonsumsi oleh manusia dapat mengakibatkan perubahan ekologis pada flora normal konsumen, sehingga menjadi resisten. Faktor resistensi ini dapat ditransmisikan ke mikroorganisme patogen dan akan menimbulkan epidemi yang tidak mudah untuk diobati dengan antibiotika yang biasa dipakai (Meyer, 1953).

Residu antibiotika dalam udang dapat menghambat pengembangan komoditi ekspor, karena negara-negara pengimpor udang akhir-akhir ini telah memberikan persyaratan yang ketat terhadap kandungan residu antibiotika tersebut. Negara-negara tersebut tidak mau menerima apabila dalam udang ekspor terbukti mengandung residu antibiotika dalam batas-batas tertentu. Hal ini pernah dialami oleh Indonesia karena ekspor udang dari Indonesia ke Uni Eropa ditolak, yang disebabkan ditemukannya residu antibiotik (kloramfenikol) sebesar 0,07 ppb dalam udang yang diimpor dari Indonesia (Anonim, 2002).

Oleh karena itu, untuk menjamin kesehatan konsumen dan meningkatkan kualitas udang, maka perlu dilakukan monitoring residu antibiotika pada udang khususnya udang ekspor.

Salah satu jenis antibiotika yang banyak digunakan di bidang perternakan udang adalah oksitetrasiklin karena memiliki toksisitas yang rendah dan spektrum aktivitas antibiotiknya yang luas, terutama terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Pada sampel ternak yang telah diberikan oksitetrasiklin biasanya didapatkan dalam bentuk campuran dengan tetrasiklin sebagai metabolit dari oksitetrasiklin sehingga pemeriksaan residu oksitetrasiklin biasanya dilakukan bersamaan dengan pemeriksaan residu tetrasiklin (Anonim, 2001). Pemeriksaan residu oksitetrasiklin di dalam udang dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan kromatografi lapis tipis. Dibandingkan dengan kromatografi lapis tipis, *HPLC* memiliki keunggulan pada limit deteksi yang lebih kecil, pelarut pengembang dan detektor *HPLC* dapat divariasikan, selain itu ketepatan dan ketelitiannya relatif tinggi (Mulya dan Suharman, 1995). Analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin secara *HPLC* telah dilakukan pada sampel daging dan makanan laut dan didapatkan batas deteksi untuk oksitetrasiklin dan tetrasiklin sebesar 1,5 ng (Horwitz, 2000).

Residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada sampel memerlukan preparasi yang khusus karena oksitetrasiklin dan tetrasiklin memiliki beberapa permasalahan dalam preparasi sampel dengan menggunakan KLT-Preparatif dan *SPE*. Permasalahan yang dapat timbul dalam pemeriksaan residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin antara lain disebabkan oksitetrasiklin dan tetrasiklin dapat berikatan dengan ion logam baik dalam sampel maupun pada saat preparasi sampel, oksitetrasiklin dan tetrasiklin juga berikatan kuat dengan protein dalam sampel, selain itu oksitetrasiklin dan tetrasiklin dapat berikatan dengan silanol didalam kolom *HPLC* sehingga dapat mempengaruhi pemeriksaan kadar residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin (Oka et al, 1995)

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas, pada penelitian ini akan dilakukan validasi metode pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam sampel udang secara *HPLC-Diode Array*, dimana detektor ini memiliki keunggulan yaitu derau dan pelayangan instrumental

yang relatif sangat kecil, sehingga untuk analisis kuantitatif sangat memadai (Mulya dan Suharman, 1995) serta mampu memberikan pengamatan pada berbagai panjang gelombang secara langsung sehingga dapat langsung menentukan panjang gelombang maksimum melalui pengamatan pada spektra 3D dan memeriksa kemurnian puncak kromatogram.

1.2 Permasalahan

Permasalahan dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimanakah kondisi optimum pemisahan (komposisi fase gerak, suhu kolom, panjang gelombang analitik) oksitetrasiklin dan tetrasiklin secara *HPLC* ?
2. Bagaimanakah presisi, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi pada metode yang telah di optimasi?
3. Berapakah harga persen perolehan kembali analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada udang dengan metode *HPLC* melalui pemisahan secara *SPE* dan KLT-Preparatif ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas, tujuan penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan kondisi optimum untuk dapat memisahkan oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan metode *HPLC*.
2. Menentukan presisi, limit deteksi, limit kuantitasi, linieritas analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan metode *HPLC* dengan kondisi yang optimal.
3. Menentukan dan membandingkan harga persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada udang dengan metode *HPLC* melalui pemisahan secara *SPE* dan KLT-Preparatif.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil yang didapat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang metode analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan metode *HPLC* yang tervalidasi, sehingga dapat membantu pihak-pihak terkait dengan bidang budidaya perikanan khususnya udang, serta para eksportir udang untuk menganalisis residu antibiotika oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang ekspor dengan metode *HPLC*, terutama untuk pemilihan preparasi sampel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Antibiotika

Antibiotika adalah senyawa kimia yang digunakan untuk membunuh bakteri (bakterisid) maupun sebagai penghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik). Pada umumnya antibiotika bekerja pada target dengan tiga mekanisme, yaitu : menghambat sintesis dinding sel, menghambat sintesis protein, dan menghambat replikasi dan perbaikan DNA (Walsh, 2000).

2.2. Tinjauan Tentang Oksitetrasiklin

2.2.1 Sifat Fisika Kimia Oksitetrasiklin

Oksitetrasiklin merupakan serbuk hablur berwarna kuning, tidak berbau, berasa pahit, dan higroskopis. Warna berubah menjadi gelap oleh pengaruh cahaya oksitetrasiklin bersifat amfoter, membentuk garam dengan asam dan basa. Dengan kalsium, magnesium, barium dan besi, oksitetrasiklin membentuk khelat. Dalam larutan pH < 2, potensi turun, cepat rusak oleh pengaruh alkali hidroksida.

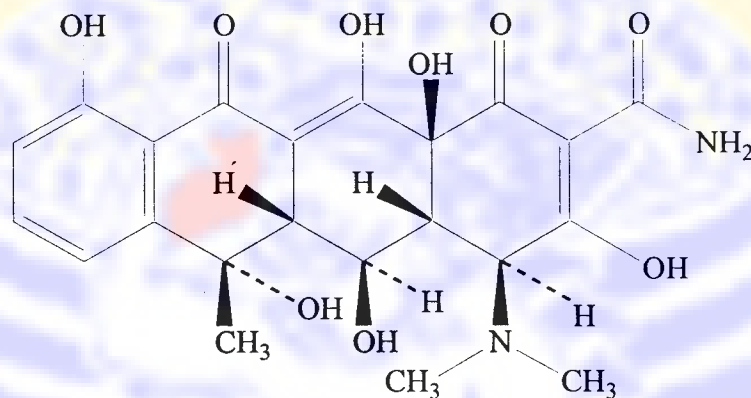
Oksitetrasiklin sangat sukar larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, mudah larut dalam HCl 3N dan larutan alkali. Oksitetrasiklin memiliki stabilitas pH antara 4.5 sampai 7.0 (Anonim, 1995). Pada oksitetrasiklin kristal, tidak hilang potensinya pada pemanasan 100⁰C selama 4 hari, hidroklorida kristal menunjukkan <5% inaktivasi setelah pemanasan 56⁰, larutan dari oksitetrasiklin HCl pada pH 1 sampai 2,5 stabil sampai 30 hari pada suhu 25⁰. Oksitetrasiklin HCl sangat mudah larut dalam air (1 g/mL), larut dalam etanol absolut, 95% etanol (Martindale, 1982).

Oksitetrasiklin termasuk golongan antibiotika berspektrum luas, efektif terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Spektrum anti bakterinya hampir sama dengan spektrum Penisilin, Streptomisin dan Kloramfenikol. Golongan ini juga menghambat pertumbuhan rickettsia, amoeba dan micoplasma Oksitetrasiklin dapat menghambat sintesis protein pada mikroorganisme, dengan menimbulkan gangguan transfer asam amino dari S/RNA ke polipeptida. Penghambatan sintesa

tersebut disebabkan oleh pembentukan khelat antara tetrasiklin dengan kalsium dan magnesium, yang diperlukan untuk aktivitas ribosom (Setiabudy dan. Kunardi, 1995).

2.2.2 Rumus Bangun Oksitetrasiklin

Rumus bangun oksitetrasiklin adalah sebagai berikut :



Gambar 2.1 Rumus bangun oksitetrasiklin ((4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimethylamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide)

2.3 Tinjauan Tentang Tetrasiklin

2.3.1 Sifat Fisika dan Kimia Tetrasiklin

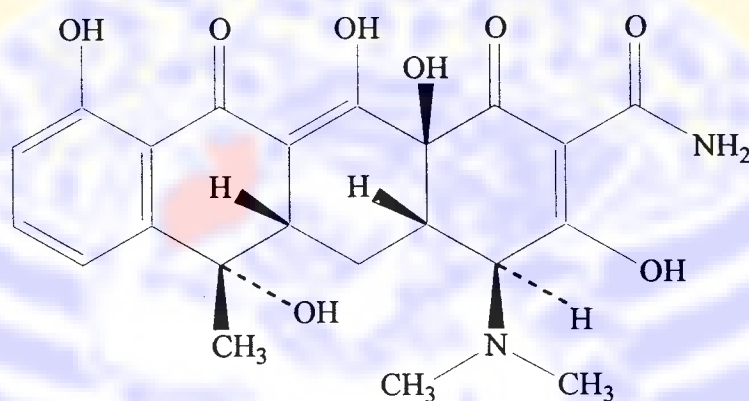
Tetrasiklin merupakan serbuk hablur kuning, tidak berbau, stabil di udara tetapi pada pemaparan dengan cahaya matahari kuat menjadi gelap. Dalam larutan pH < 2, potensi berkurang cepat rusak dalam larutan alkali hidroksida.

Tetrasiklin sangat sukar larut dalam air, mudah larut dalam larutan asam encer dan dalam larutan alkali hidroksida, sukar larut dalam etanol, praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter. Stabilitas dari tetrasiklin pada pH antara 3.0 sampai 7.0. Tetrasiklin HCl larut dalam air, larut dalam metanol, etanol, tidak larut dalam eter, pelarut hidrokarbon, pH dari larutan 2% 2,1- 2,3 (Anonim, 1995).

Tetrasiklin termasuk golongan antibiotika berspektrum luas, efektif terhadap Gram-positif dan Gram-negatif. Mekanisme kerja dari tetrasiklin sama dengan oksitetrasiklin.

2.3.2. Rumus Bangun Tetrasiklin

Rumus bangun dari tetrasiklin adalah sebagai berikut :



Gambar 2.2 :Rumus bangun tetrasiklin((4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimethylamino)-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide)

2.4 Toksisitas Golongan Tetrasiklin

Golongan tetrasiklin memperlambat koagulasi darah dan memperkuat efek antikoagulan kumari, hal ini disebabkan terbentuknya khelat dengan kalsium, tetapi mungkin juga karena golongan tetrasiklin mempengaruhi sifat fisika kimia lipoprotein plasma, selain itu golongan tetrasiklin dapat menimbulkan imbalance nitrogen negatif dan meningkatkan ureum darah. Hal ini tidak menimbulkan arti klinik pada manusia dengan faal ginjal yang normal, tetapi pada keadaan gagal ginjal dapat timbul azotemia. Toksisitas lain yang ditimbulkan golongan tetrasiklin adalah dapat menimbulkan kelainan darah tepi seperti leukositosa, limfosit atipik, granulasi toksit pada granulasi dan trombositopenia bila mengkonsumsi dalam jangka waktu yang lama. Golongan tetrasiklin terikat pada jaringan tulang yang sedang tumbuh dan membentuk kompleks, sehingga menyebabkan pertumbuhan tulang terhambat (Setiabudy dan Kunardi, 1995).

2.5 Residu Antibiotik Dalam Udang

2.5.1 Terjadinya Residu Udang

Residu antibiotika dalam bahan makanan asal hewan dapat timbul dengan cara-cara sebagai berikut : penggunaan antibiotika dalam makanan ternak untuk pencegahan infeksi suatu penyakit pada sekelompok ternak, penggunaan antibiotika oleh dokter hewan untuk pengobatan suatu penyakit. Faktor-faktor tersebut dapat menyebabkan adanya residu pada jaringan hewan, yang pada akhirnya sampai ke konsumen (Anonim, 1999).

2.5.2 Batas Residu Antibiotik

Residu antibiotik dalam bahan makanan pada umumnya hanya ada dalam jumlah yang sangat kecil. Menurut persyaratan sebaiknya tidak ada residu antibiotik dalam bahan makanan. Tetapi adanya residu dapat tidak terdeteksi, karena tergantung kepada kepekaan metode yang digunakan. Oleh karena itu, setiap jumlah residu yang dapat dideteksi seharusnya dilaporkan atau bila tidak terdeteksi, harus disebutkan kepekaan metode yang digunakan. Pada negara-negara pengimpor udang memberikan batasan adanya residu oksitetrasiklin sebesar 0,1 ppm (Anonim, 1993)

2.5.3 Dampak Residu Antibiotika

Residu antibiotika dikhawatirkan dapat menyebabkan perkembangan organisme resisten dalam tubuh. Hal ini berhubungan dengan adanya peningkatan kumpulan organisme resisten dalam usus, akan menimbulkan bahaya karena peluang untuk transmisi organisme akan meningkat. Apabila faktor resisten ditransmisikan kepada organisme patogen, maka akan timbul epidemi yang tidak mudah diobati dengan anti biotika yang biasa dipakai.

2.6 Tinjauan Tentang HPLC

Mekanisme pemisahan yang mendasari *HPLC* adalah proses adsorpsi, partisi, pertukaran ion atau permeasi gel, dimana mekanisme tersebut pada dasarnya ada satu kesamaan konsep, yaitu konsep distribusi solut dalam sistem dua fase yang dinyatakan dengan koefisien distribusi (*K*).

Distribusi solut dalam dua fase tersebut, yaitu fase diam dan fase mobil dapat terjadi karena perbedaan gaya adsorpsi (kromatografi adsorpsi) kelarutan (kromatografi partisi) afinitas terhadap resin penukar ion atau ukuran beratmolekul solut (kromatografi permeasi). Prinsip dasar yang dapat digunakan untuk semua tipe kromatografi di atas adalah mekanisme pemisah berdasarkan peristiwa partisi.

2.6.1 Gerbang Suntik

Pemasukan atau injeksi sampel untuk analisis dengan metode *HPLC* sangat penting, sebab hasil kromatogram yang ditampilkan akan tidak memadai kalau injeksi sampel dilakukan tidak tepat.

Ada tiga macam sistem injektor pada *HPLC* yaitu :

1. Injektor dengan memakai diafragma (septum)
2. Injektor tanpa septum
3. Injektor dengan pipa dosis

Sistem dengan pipa dosis merupakan pilihan yang sangat tepat pada *HPLC* khususnya untuk analisa kuantitatif. Prinsip kerja pipa dosis adalah “ *Load-inject* “ ini berarti pada keadaan pertama sampel akan masuk loop dan akhirnya dengan volume yang tidak berkurang sedikitpun segera masuk menuju kolom pemisahan.(Mulya dan Suharman,1995).

2.6.2 Pompa Cairan

Beberapa persyaratan sistem pompa *HPLC* adalah :

1. Memberikan tekanan sampai 6000 – 8000 psi
2. Sama sekali bebas pulsa
3. Memberikan kecepatan aliran 0,1-10 ml/menit
4. Alirannya terkontrol dengan reproduibilitas 0,5% atau kurang (lebih baik)
5. Anti karat

Ada tiga macam jenis pompa yang banyak dipakai pada *HPLC*, ketiga pompa tersebut adalah :

1. *Reciprocating Pumps*
2. *Displacement Pumps (Syringe pumps)*
3. *Pneumatic Pumps (Constant Pressure Pumps)*

Ketiga macam pompa tersebut masing-masing memberikan kelebihan dan kekurangan. Pada umumnya saat ini pompa *HPLC* sudah dilengkapi dengan bagian pompa yang lain yaitu kontrol aliran dengan sistem terprogram (merupakan unit bagian pompa) yang dikendalikan dengan komputer (Mulya dan Suharman,1995).

2.6.3 Oven Kolom

Kolom *HPLC* diletakan di dalam oven untuk menjaga temperatur kolom supaya stabil (tetap sesuai dengan program). Hal ini sangat penting untuk memperoleh stabilitas dan keterandalan dalam analisis dengan metode *HPLC*. Oven kolom yang banyak dipakai adalah dengan sistem sirkulasi udara panas yang bertekanan. Oven kolom dapat memuat kolom *HPLC* sampai 4 kolom sekaligus dengan temperatur kerja sampai 99⁰C (Mulya dan Suharman,1995).

2.6.4 Kolom Fase Terbalik

Kromatografi dengan kolom yang fase diamnya bersifat non polar, sedangkan fase geraknya bersifat polar (kebalikan fase normal). Untuk mendapatkan fase diam yang non polar, silika gel direaksikan dengan klorosilan Cl-Si-(R)_n. Fase diam yang non polar yang banyak dipakai adalah jenis ; C₁₈, C₈, dan C₂. (Mulya,M dan Suharman,1995).

Keuntungan kromatografi fase terbalik :

1. Dengan kromatografi fase terbalik air dapat digunakan sebagai salah satu pelarut pengembang campur.
2. Senyawa yang polar akan lebih baik pemisahannya pada kromatografi fase terbalik
3. Senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak terpisahkan pada *HPLC* normal akan dapat terpisahkan pada kromatografi fase terbalik

2.6.5 Detektor Diode-Array

Detektor “ Photo Diode-Array ” adalah detektor UV-Vis dengan beberapa keistimewaan :

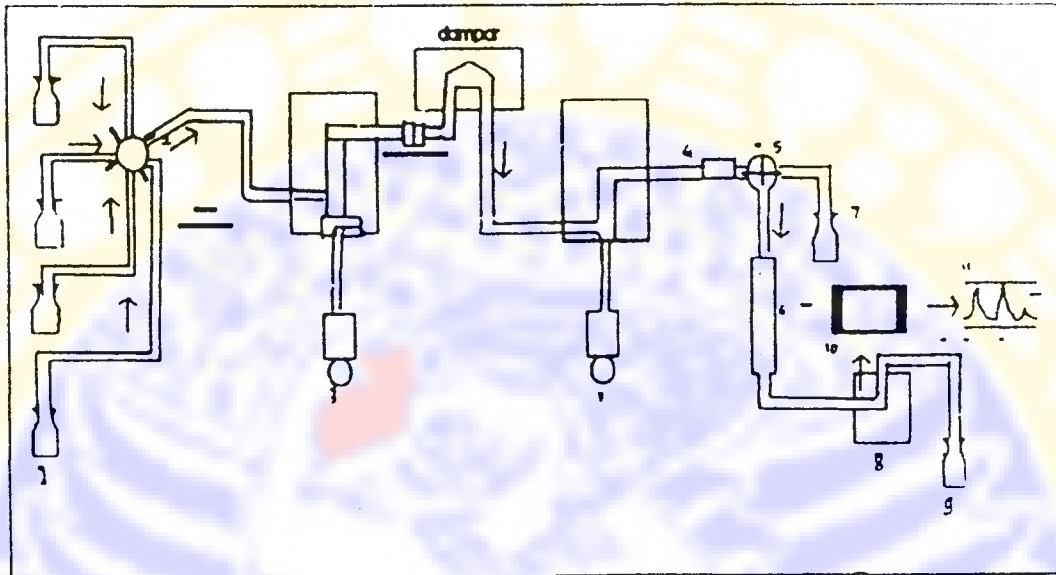
1. Sistem optik tidak memakai cermin dan menjamin “ *Spectral Purity* ” dan mengabaikan “*Stray Radiation*”.
2. Hanya ada satu lensa fokus.
3. Detektor yang tidak ada pergerakan mekanis sehingga menjamin ketepatan panjang gelombang penentuan.
4. Kecepatan deteksinya 300-400 kali detektor *PMT*.
5. Rentang pengukuran 190-600 nm.
6. Holografik Grating yang tidak bergerak.

Detektor UV-Vis “ Photo Diode-Array “ merupakan detektor yang sudah banyak dipakai pada *HPLC*, karena detektor UV-Vis “ Photo Diode-Array “ menjamin derau dan pelayangan instrumental yang relatif kecil (terabaikan).

Pemakaian detektor UV-Vis “ Photo Diode-Array “ untuk analisis multikomponen dengan sistem elusi gradien pada *HPLC* dapat dikatakan sangat memadai untuk “ *Quantitative accuracy* “ (Mulya dan Suharman,1995).

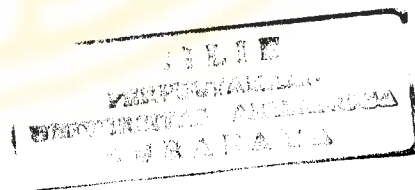
2.6.6 Instrumentasi HPLC

Pada garis besarnya instrumentasi HPLC urutan letaknya seperti pada gambar berikut :



Gambar 2.3 Diagram alat pada HPLC

1. Botol-botol eluen
2. Pompa tekanan rendah
3. Pompa tekanan tinggi
4. Kolom pelindung
5. Gerbang suntik
6. Kolom analitik
7. Pembuangan
8. Detektor
9. Penampung eluen
10. Integrator
11. Kromatogram

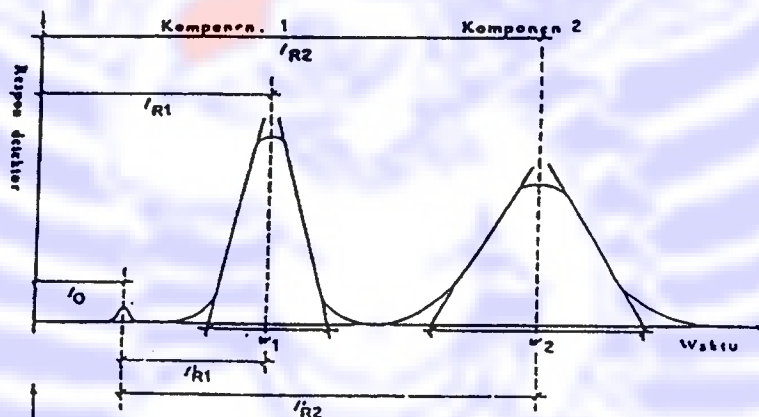


2.7 Parameter HPLC

Parameter yang biasa digunakan dalam HPLC adalah :

2.7.1 Waktu Tambat (t_r)

Waktu tambat atau waktu retensi (*retention time*) adalah selang waktu yang diperlukan oleh solut mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya dapat ditangkap oleh detektor. Pengukuran waktu tambat tidak dapat dipakai untuk mengidentifikasi suatu komponen, karena waktu tambat (t_r) ditentukan oleh susunan dan cara kerja kolom, sehingga waktu tambat adalah karakteristik terhadap suatu komponen, tetapi tidak spesifik



Gambar 2.4 Kromatogram hasil analisis dengan HPLC

Keterangan :

- t_{R1} dan t_{R2} = Waktu yang dibutuhkan komponen 1 dan 2 untuk menempuh jarak sepanjang kolom.
- t_0 = Waktu yang dibutuhkan fase gerak untuk melulusi komponen yang tidak ditahan kolom.
- W_1 dan W_2 = Lebar dasar puncak 1 dan 2 yang diukur diantara titik potong garis singgung pada kedua sisi poros horisontal.
- t'_{R1} dan t'_{R2} = Waktu tambat komponen 1 dan 2 yang terkoreksi.

2.7.2 Faktor Selektivitas (α)

Faktor selektivitas menggambarkan posisi relatif dua puncak komponen yang berdekatan yaitu perbandingan waktu tambat komponen A dengan waktu tambat komponen B. Harga faktor selektivitas dapat dihitung melalui rumus :

$$\alpha = \frac{t_r B}{t_r A}$$

agar terjadi pemisahan hendaknya α mempunyai harga >1 , karena pada harga $\alpha = 1$, komponen A dan komponen B tidak terpisahkan. Makin besar harga α pemisahan semakin baik.

2.7.3 Derajat Keterpisahan

Derajat keterpisahan didefinisikan sebagai jarak antara 2 puncak dibagi dengan lebar rata-rata kedua puncak alasnya. Harga R_s dapat dihitung melalui rumus :

$$R_s = 2 \frac{t_r B - t_r A}{W_A + W_B}$$

Agar kedua puncak dapat terpisah sempurna, maka harga $R_s > 1,5$ kedua puncak dapat terpisah sampai garis dasarnya.

2.8 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis

Untuk mendapatkan hasil yang mendekati kebenaran suatu penelitian, maka harus dilakukan lebih dahulu uji validasi metode disamping uji validasi dari peralatannya. Paramater yang dipakai pada validasi metode adalah selektivitas, linieritas, penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi, akurasi dan presisi.

2.8.1 Akurasi (Ketepatan)

Ketepatan metode analisis adalah keterdekatan hasil analisis yang diperoleh dengan memakai metode tersebut dengan harga yang sebenarnya. Penentuan ketepatan metode analisis biasanya dinyatakan dengan persen perolehan kembali terhadap sampel yang kadarnya telah diketahui dengan pasti. Untuk penentuan ketepatan dibuat sampel dengan konsentrasi yang diketahui dan ditentukan harga persen perolehan kembali. Persyaratan ketepatan yang baik untuk penentuan analit

dalam obat antara 95%-105% dan untuk penentuan sampel biologis 81%-120%, akan tetapi untuk penentuan sampel biologis (bioanalisis) dikatakan memadai pada kondisi +. 2% dari kadar analit fisiologis rata-rata. Untuk menghitung persen perolehan kembali dapat digunakan rumus :

$$R = \frac{Kp}{Ks} \times 100\%$$

$$Kp = \frac{Asp}{Ast} \times Cstd$$

Dimana :

R = persen perolehan kembali

Kp = kadar yang didapat setelah perlakuan

Ks = kadar sesungguhnya

Asp = area sampel

Ast = area standar

Cst = konsentrasi standar

2.8.2 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan membedakan antara zat yang dianalisa dengan zat lain yang tidak diinginkan. Pada metode *HPLC*, sistem yang dipakai harus selektif untuk zat yang ditentukan. Hal ini berarti bahwa puncak zat zat tersebut pada kromatogram harus terpisah dari zat lain, misalnya zat yang strukturnya mirip, agar terjadi pemisahan yang baik maka harga resolusinya sebaiknya lebih besar dari 1,5 (Meyer, 1988).

2.8.3 Presisi (Kecermatan)

Presisi suatu metode analisis harus dapat diulang terhadap sampel yang sama dengan prosedur yang sama dan hasil penentuan yang memenuhi persyaratan statistik secara umum. Ada beberapa macam ukuran presisi, yang paling umum dipakai adalah standar deviasi dan Koefisien Variasi (KV) atau Relative Standart Deviation (RSD). Bila RSD lebih kecil atau sama dengan 10%. Maka presisi metode itu baik. Untuk menghitung koefisien variasi digunakan :

$$KV = \frac{SD}{X} \times 100 \%$$

Dimana :

KV = koefisien variasi

SD = simpangan deviasi

X = hasil rata-rata pengukuran

2.8.4 Keterulangan

1. *Repeatability* : Apabila metode analisis tersebut diulang oleh analis yang sama dan kondisi yang sama (reagen instrumen, setting, dan laboratorium) memberikan presisi yang tidak signifikan pada periode waktu yang tidak terlalu lama.
2. *Reproducibility* : Apabila metode analisis tersebut diulang oleh analis dan kondisi laboratorium yang berbeda memberikan presisi yang tidak signifikan.
3. *Intermediate* : Apabila metode analisis tersebut diulang oleh analis atau instrumen yang berbeda dengan laboratorium yang sama atau variasi laboratorium dengan hari yang berbeda memberikan presisi yang tidak signifikan.

2.8.5 Sensitivitas

Sensitivitas suatu metode analisis harus diketahui batas kadar terkecil yang dapat ditentukan untuk analisis kuantitatif yang dikenal sebagai *LOD (Limit of detection)*. *LOD* adalah suatu parameter untuk penentuan suatu sampel dengan kadar yang terkecil akan tetapi masih memberikan tanggapan detektor yang berbeda dengan pembanding (tanpa sampel). Sedangkan *LOQ (Limit of quantitation)* adalah kadar yang terkecil dari sampel yang dapat dianalisis dengan hasil penentuan kuantitatif yang menunjukkan kecermatan dan ketelitian yang memadai. Agar kesahihan, kecermatan dan ketelitian dapat terjamin *LOQ* besarnya minimal 5 kali *LOD*. Untuk menghitung batas deteksi dan batas kuantitasi digunakan rumus :

$$C = \frac{k \cdot Sb}{S}$$

dimana :

C = Konsentrasi pada batas deteksi atau batas kuantitasi

k = Ketetapan batas deteksi =3; dan untuk batas kuantitasi = 10

Sb = Standar deviasi *Analytical Blank Signal*

S = Sensitivitas *slope* (Indrayanto, 1994)

Langkah pertama menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi adalah penentuan ratio S (Signal = tanggap detektor) dan N (*noise* = derau) pada kondisi batas yang digunakan dimana untuk membedakan antara puncak analit dan blanko harga S/N harus tidak boleh kurang dari 5. Selanjutnya dicari harga standar deviasi dari garis dasar, harga Sb dapat dicari melalui pengukuran variasi derau garis dasar pada daerah 20 kali lebar puncak terbesar kromatogram blanko (Np-p), dimana harga Sb = (Np-p)/5.

Harga S merupakan harga slope dari persamaan garis regresi hubungan antara suatu seri konsentrasi analit (n = 4-5) yang relatif kecil dengan tinggi puncak kromatogramnya. Dari harga S maka dihitung harga batas deteksi dan batas kuantitasi (Carr dan Wahlich, 1990).

2.8.6 Linieritas

Linieritas atau *IDR (Instrumental Dynamic Range)* yaitu suatu rentangan kadar yang terendah sampai kadar tertinggi yang ditentukan dengan metode analisis dan direlasikan dengan tanggap detektor dengan koefisien korelasi yang mendekati harga satu dan sesuai dengan hukum metode analisis yang dipakai. Untuk maksud analisis kuantitatif yang dipakai sebagai parameter yaitu bermacam-macam sebagai absis pada koordinat Cartesian. Sedangkan sebagai ordinat dapat dipakai tanggap detector yang merupakan area kromatogram pada *HPLC*. Umumnya dibuat kurva linier dengan konsentrasi 25 – 200 % dari kadar zat yang dianalisis. Sebagai parameter adanya hubungan linier atau tidak digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier yang dapat dihitung melalui rumus :

$$y = a + bx$$

dimana :

$$a = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum y)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - n \cdot \sum x}{n}$$

koefisien korelasi :

$$r = \frac{n \cdot \sum (x_i \cdot y_i) (\sum y_i) (\sum x_i)}{\sqrt{(n \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2) (n \cdot \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2)}}$$

dimana :

r = koefisien korelasi

x_i = jumlah zat yang diamati

y_i = area kromatogram

n = jumlah data

2.9 Tinjauan Metode Pemisahan

2.9.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran zat yang didasarkan atas perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponennya pada fase diam dibawah pengaruh suatu pelarut yang bergerak (Gearin, 1969). Fase diam yang digunakan dapat berupa bahan padat atau bahan cair yang didukung oleh bahan padat yang dilekatkan pada gelas, logam atau plastik (Macek, 1972). Sedangkan fase geraknya adalah kombinasi cairan yang bersifat polar ataupun nonpolar dengan perbandingan tertentu. Mekanisme terjadinya pemisahan pada kromatografi dapat berdasarkan atas prinsip adsorpsi, partisi, pertukaran ion, maupun filtrasi, tergantung pada bahan yang dipakai. Tetapi pada umumnya

adalah atas dasar adsorpsi dan partisi (Gearin, 1969). Pada kromatografi lapis tipis komponen sampel yang akan dipisahkan berada pada fase diam dan fase gerak dilewatkan pada fase diam. Pemisahan terjadi jika salah satu substansi dalam campuran lebih kuat diadsorpsi oleh fase diam dari pada komponen yang lain dalam campuran, atau sebaliknya.

Kemampuan komponen untuk terdistribusi dalam fase diam dan fase gerak tergantung pada konstanta yang disebut koefisien distribusi (k), dimana harga k adalah:

$$k = \frac{C_s}{C_m}$$

Keterangan:

- k = koefisien distribusi
- C_s = konsentrasi solut dalam fase diam
- C_m = konsentrasi solut dalam fase gerak

Dasar pengukuran suatu substansi dalam KLT adalah harga R_f (faktor retardasi), yaitu:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh solven}}$$

Harga R_f merupakan parameter yang menyatakan posisi noda setelah dielusi pada kromatogram. Harga R_f tersebut besarnya antara 0 sampai 0,999 diukur dari pusat noda (Gearin, 1969; Touchstone, 1983)

2.9.2 *Solid Phase Extraction (SPE)*

Solid Phase Extraction (SPE) merupakan metode ekstraksi yang menggunakan fase padat dan fase cair untuk mengisolasi suatu analit dari suatu larutan. Metode ini sering dipakai untuk penyiapan sampel sebelum suatu analit dianalisis secara kromatografi atau metode analisis lain yang tujuannya untuk menentukan kadar suatu analit dalam suatu sampel.

Prosedur umum dari metode ekstraksi secara *SPE* adalah dengan mengisir komponen yang tidak diperlukan (selain analit yang akan dianalisis) dengan suatu

pelarut atau campuran pelarut kemudian dilanjutkan dengan pengambilan analit yang akan dianalisis dengan menggunakan pelarut yang sesuai.

Penggunaan fase diam pada *SPE* pada dasarnya hampir sama dengan yang dipakai pada kromatografi kolom cair. Fase diam dipakai bahan dari plastik atau gelas diatas glass wool. Pada kolom dimungkinkan adanya glass wool pada bagian atas fase diam dan dimungkinkan juga adanya sebuah “*stopcock*” untuk mengontrol aliran pelarut pada saat melewati kolom. Kolom *SPE* komersial memiliki kapasitas 1-10 ml dan digunakan sekali pakai (Tissue, 2000).

2.10 Analisis Oksitetrasiklin dan Tetrasiklin Secara HPLC

HPLC banyan digunakan untuk analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam berbagai sampel, seperti bahan pangan dan zat tambahan makanan, daging (Horwitz, 2000), makanan laut (Ahuja, 1995). Adapun kolom, fase gerak dan detektor yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1. Sebelum sampel diinjekkan pada instrumen *HPLC*, sampel umumnya dipreparasi terlebih dahulu. Preparasi sampel dapat dilakukan dengan cara ekstraksi padat-cair (*SPE*) atau KLT-preparatif. Tabel 2 menunjukkan komposisi fase gerak yang pernah dilakukan untuk pemisahan oksitetrasiklin dan tetrasiklin secara KLT.

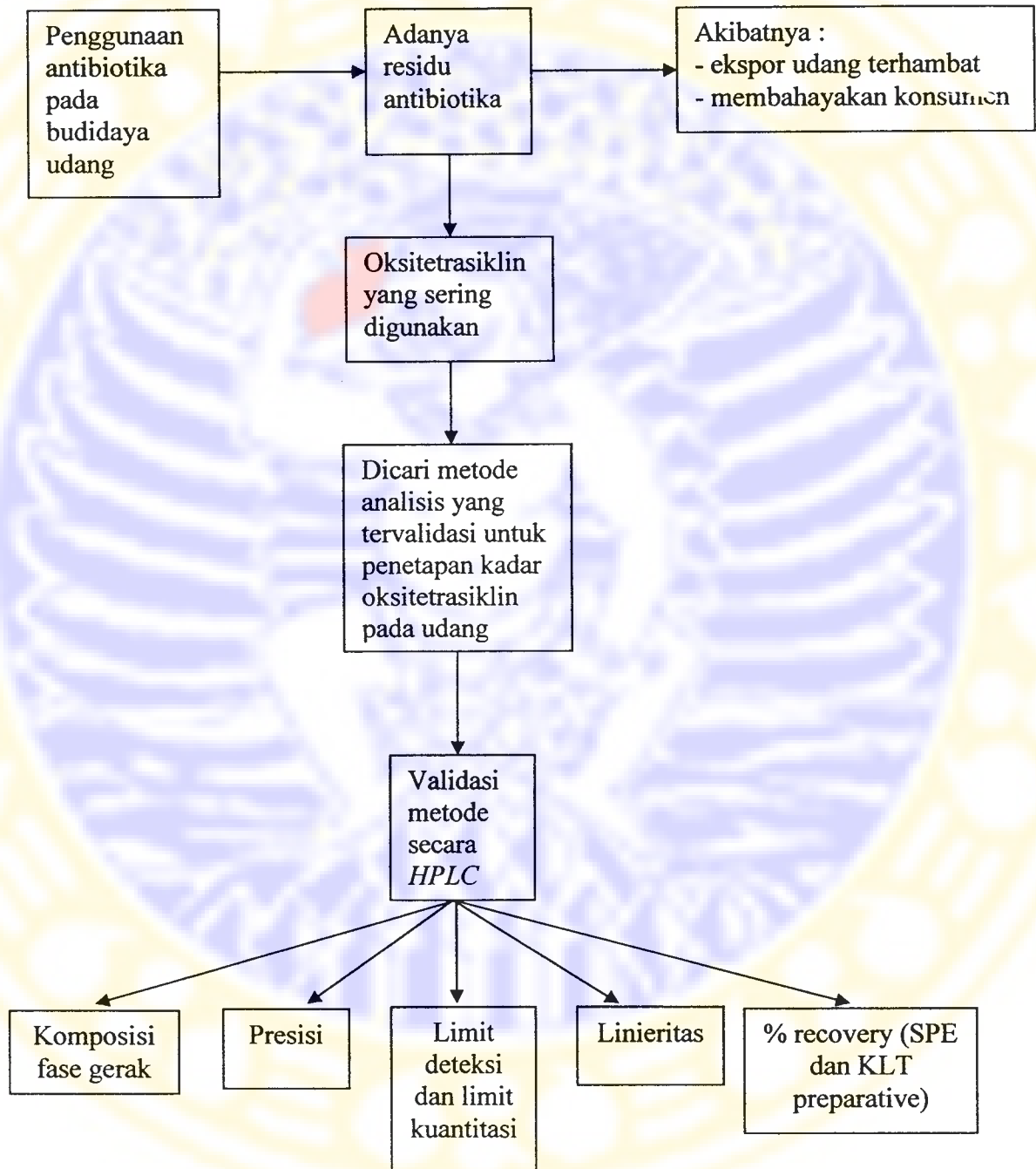
Tabel II.1 Analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang pernah dilakukan

Kolom	Fase gerak	Detektor	Sampel	Pustaka
Wakosil-II 5C18 HG, 4.6mm I.D. x 150mm	Metanol : Imidazol buffer = 20 :80 (v/v)	FL Ex.380nm Em.520nm SENS=HI, RANGE =1, ATTEN =4	Makanan, zat tambahan makanan	http://www.wakochem.co.jp/siyaku/info/chromato/pdf_app/drug/02.htm
5LC Column, 250 x 4,6 mm id, C8	Oxalic acid : acetonitrile : metanol = 600 : 300 :100	UV at 350 nm	Daging	Horwitz, William. 2000
A Nucleosil C-18	Acetonitrile : N,N dimethylformamide : 0,01 M oxalic acid = 27 : 6 : 67	Detektor UV	Makanan laut	Ahuja, Satinder, 1995

Tabel II.2 Macam-macam eluen untuk KLT oksitetrasiklin dan tetrasiklin

Komposisi Eluen	Perbandingan	Pustaka
Kloroform : Metanol	10 : 1	Markakis, P.K, 1996
Kloroform: Metanol : 5% larutan Na ₂ EDTA Silika gel diimpregnasi dengan 5% larutan Na ₂ EDTA	13 : 4 : 1	Kochansky, Jan, 2000
10% EDTA dengan Diklorometan : metanol : air	59 : 35 : 6	Ahuja, Satinder, 1995
Metanol : Asetronitril	1 : 1	Gafner, J.L, 1999

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Alat dan Bahan

4.1.1 Alat

1. Instrumen *HPLC* 1100-61311A Agilent, kolom Hypersil ODS 5 μm , 150 mm; 4,6 mm dan Hypersil BDS 5 μm , 250 mm; 4,6 mm, detektor Diode-Array.
2. Lempeng KLT (E. Merck).
3. Ultrasonikator (Julabo).
4. Sentrifus (Hettich)
5. Neraca Analitik (Mettler Toledo AB104)
6. Nylon Membrane Filter 0,2 μm (Whatmann)
7. *Freeze Dryer*

4.1.2 Bahan

1. Standar Oksitetrasiklin dan Tetrasiiklin (Sigma-Aldrich)
2. Udang beku ekspor
3. Metanol p.a (Merck)
4. Metanol p.*HPLC* (J.T.Baker)
5. Asetonitril p.*HPLC* (Merck)
6. Asam oksalat p.a (Merck)
7. n-Heksana p.a (Merck)
8. Aqua Bidestilata Pro Injection (PT. Ikapharmindo Putramas)
9. Na_2HPO_4 p.a (Merck)
10. Asam sitrat p.a (Merck)
11. Na-EDTA (Merck)

4.2 Optimasi Kondisi *HPLC*

4.2.1 Penentuan Panjang Gelombang

Disuntikkan ke dalam *HPLC* metanol dan larutan standar campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin, kemudian diamati dan ditentukan panjang gelombang pengamatan campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

4.2.2 Pemilihan Kolom

Disuntikkan larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin ke dalam *HPLC* dengan fase gerak metanol : asetonitril : asam oksalat 0.01 M pH 2,5 + 6% DMF (5 : 15 : 80), kolom Hypersil ODS C-18 5 μ m 4,6 mm x 150 mm, pada panjang gelombang terpilih butir 4.2.1, aliran 1 mL/menit, suhu 30 °C, dan detektor *Diode-Array*.

Kemudian dengan konsentrasi yang sama disuntikkan larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin kedalam *HPLC* dengan kondisi fase gerak metanol : asetonitril : asam oksalat 0.01 M pH 2,5 + 6% DMF (5 : 15 : 80), kolom Hypersil BDS C-18 5 μ m 4,6 mm x 250 mm, pada panjang gelombang terpilih butir 4.2.1, aliran 1 mL/menit, suhu 30 °C, dan detektor *Diode-Array*.

Diamati dan dibandingkan waktu tambat, selektivitas, dan derajat keterpisahan (R_s) dari kromatogram yang dihasilkan antara kolom Hypersil ODS C-18 5 μ m 4,6 mm x 150 mm dan Hypersil BDS C-18 5 μ m 4,6 mm x 250 mm.

Kolom terpilih selanjutnya digunakan sebagai fase diam pada penelitian ini.

4.2.3 Optimasi Kondisi *HPLC* (Pengaruh Sampel Udang)

Disuntikkan metanol, larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin, larutan oksitetrasiklin, larutan tetrasiklin, sampel udang (hasil ekstraksi), dan sampel udang (hasil ekstraksi) yang mengandung larutan campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin ke dalam *HPLC* dengan kondisi *HPLC* dan kolom terpilih sesuai butir 4.2.2 kemudian diamati waktu tambat, selektivitas, dan derajat keterpisahan (R_s) antara kromatogram metanol, larutan baku campuran, sampel udang, dan sampel udang yang mengandung campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

Diamati dan dibandingkan juga spektra antara larutan baku oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan spektra sampel udang yang mengandung campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

4.3 Validasi Metode

4.3.1 Pembuatan Larutan baku Campuran Oksitetrasiklin dan Tetrasiklin

Ditimbang teliti oksitetrasiklin dan tetrasiklin seberat 100 mg dan dilarutkan dalam metanol sampai 100,0 mL (1000 ppm). Dari baku induk 1000 ppm tersebut diencerkan sehingga diperoleh larutan dengan kadar 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0,7 ppm, 0,6 ppm, 0,5 ppm, 0,4 ppm, 0,3 ppm, 0,2 ppm.

4.3.2 Penentuan Selektivitas (α) dan Derajat Keterpisahan (R_s)

Larutan sampel udang hasil ekstraksi yang mengandung oksitetrasiklin dan tetrasiklin disuntikkan pada *HPLC*, dan diamati kromatogramnya, kemudian dihitung selektivitas (α) dan derajat keterpisahannya (R_s).

4.3.3 Penentuan Linieritas

Larutan baku dengan kadar 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm masing-masing disaring dengan membran filter 0,2 μ m kemudian diinjeksikan pada instrumen *HPLC*, dari kromatogramnya dihitung koefisien korelasi melalui persamaan garis regresi antara konsentrasi dengan luas puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

4.3.4 Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Larutan baku dengan kadar 0,2 ppm, 0,3 ppm, 0,4 ppm, 0,5 ppm, 0,6 ppm, 0,7 ppm, masing-masing disaring dengan membran filter 0,2 μ m kemudian diinjeksikan pada instrumen *HPLC*, dari kromatogram yang diperoleh dihitung koefisien korelasi melalui persamaan garis regresi antara konsentrasi dengan tinggi puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin. Kemudian dihitung batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ).

4.3.5 Penentuan Presisi (Kecermatan)

Larutan baku 2 ppm diinjeksikan pada *HPLC* dan dielusi dengan kondisi sesuai dengan hasil optimasi (sesuai butir 4.2), lakukan sebanyak 10-15 kali. Dari kromatogramnya ditentukan harga KV.

4.3.6 Penentuan Persen Perolehan Kembali (Akurasi) dan Presisi Metode

4.3.6.1 Pembuatan larutan 0,1 M EDTA-*McIlvaine*-Buffer pH 4,0

Campur 70,6 mL larutan 100 mM asam sitrat dengan 131,7 mL larutan 500 mM Na_2HPO_4 kemudian pH larutan diatur sampai pH 4,0 dengan penambahan air sampai 400 mL. Larutkan 14,889 g Na-EDTA dalam 400 mL larutan *McIlvaine*-buffer pH 4,0. (Mary C et al, 2001)

4.3.6.2 Penentuan Susut Pengeringan Udang

Ditimbang 100 g udang basah (3x) dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 24 jam, udang kering ditimbang dan dihitung rata-rata berat kering.

4.3.6.3 Akurasi dan Presisi Metode Dengan Pemisahan Secara KLT-Preparatif

4.3.6.3.1 Pemilihan Eluen KLT

Pada 5 buah Lempeng KLT diimpregnasi dengan larutan 5% EDTA lalu dipanaskan 100°C selama 30 menit, kemudian ditotolkan larutan baku masing-masing $5\mu\text{g/mL}$, kemudian dielusi dengan eluen masing-masing adalah metanol : asetonitril dengan perbandingan (1:1), (3:1), (4:1), (5:1) dan eluen kloroform : metanol dengan perbandingan (10:1). Dievaluasi harga Rf yang didapat, pemisahan noda oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan komponen lain dari matriks udang, serta noda hasil elusi yang tidak berekor (*tailing*).

Kondisi eluen hasil evaluasi harga Rf dan pengamatan noda selanjutnya digunakan sebagai kondisi eluen untuk KLT.

4.3.6.3.2 Akurasi dan Presisi Metode

Ditimbang udang kering sesuai hasil penentuan berat kering pada butir 4.3.6.2 sebanyak lima kali, empat kelompok replikasi udang diadisi dengan 5 mg oksitetrasiklin dan tetrasiklin, satu kelompok replikasi yang lain sebagai blanko, kemudian udang diekstraksi dengan 80 mL n-Heksana (dilakukan sebanyak lima sampai tujuh kali) dengan tahapan diultrasonikasi selama 20 menit, diseker selama 5 menit, didiamkan lalu didekantir, larutan dalam n-Heksana dibuang. Residu diekstraksi kembali dengan 40 mL metanol (dilakukan sebanyak tiga sampai lima kali) dengan tahapan diultrasonikasi selama 20 menit, diseker selama 5 menit, didiamkan lalu didekantir, larutan dalam metanol ditampung dalam cawan, kemudian diuapkan dalam lemari asam, ekstrak kering diekstraksi kembali dengan 3 mL metanol. Larutan dalam metanol ditampung dalam vial, diuapkan sampai $\pm 0,5$ mL, ditotolkan pada plat KLT-Preparatif dengan pembanding standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin, dilusi dengan eluen sesuai hasil optimasi pada butir 4.3.6.3.1, noda sampel yang sesuai dengan noda standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin dikerok dan kerokan dimasukkan dalam tabung reaksi, kerokan diekstraksi dengan 15 mL metanol dengan tahapan divorteks 2 menit, diultrasonikasi 20 menit, dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit, larutan dalam metanol ditampung di beker glass, diuapkan dalam lemari asam (ekstraksi dilakukan sebanyak tiga sampai lima kali), ekstrak kering dilarutkan dalam 5,0 mL, disaring dengan kertas Whatmann 0.2 μm , diinjeksikan pada HPLC, dibandingkan antara kromatogram blanko dan kelompok replikasi yang telah diadisi dengan oksitetrasiklin dan tetrasiklin, dipastikan bahwa pada waktu tambat oksitetrasiklin dan tetrasiklin tidak ada puncak-puncak pengganggu dari sampel udang, kemudian dihitung persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin

4.3.6.4 Akurasi dan Presisi Metode Dengan Pemisahan Secara SPE

Ditimbang 20 g udang basah yang telah diblender sebanyak lima kali, empat kelompok replikasi udang diadisi dengan 0.1 mg oksitetrasiklin dan tetrasiklin, kemudian udang diekstraksi dengan 50 mL 0.1 M *EDTA-McIllvaine buffer* dengan tahapan diultrasonikasi selama 20 menit, diseker 5 menit, didiamkan lalu didekantir, larutan ditampung dalam labu, dikeringkan dengan menggunakan

Freeze Drying selama ± 12 jam. Hasil kering dalam labu dilarutkan 3 mL air, dipisahkan dengan *SPE* yang telah dikondisikan dengan metanol, kemudian dengan larutan *McIllvaine buffer*, kemudian diuapkan dalam lemari asam, ekstrak diadkan 10 mL dengan metanol, disaring dengan kertas Whatmann 0,2 μm , diinjekkan pada *HPLC*, dibandingkan antara kromatogram blanko dan kelompok replikasi yang telah diadisi dengan oksitetrasiklin dan tetrasiklin, dipastikan bahwa pada waktu tambat oksitetrasiklin dan tetrasiklin tidak ada puncak-puncak pengganggu dari sampel udang, kemudian dihitung persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin

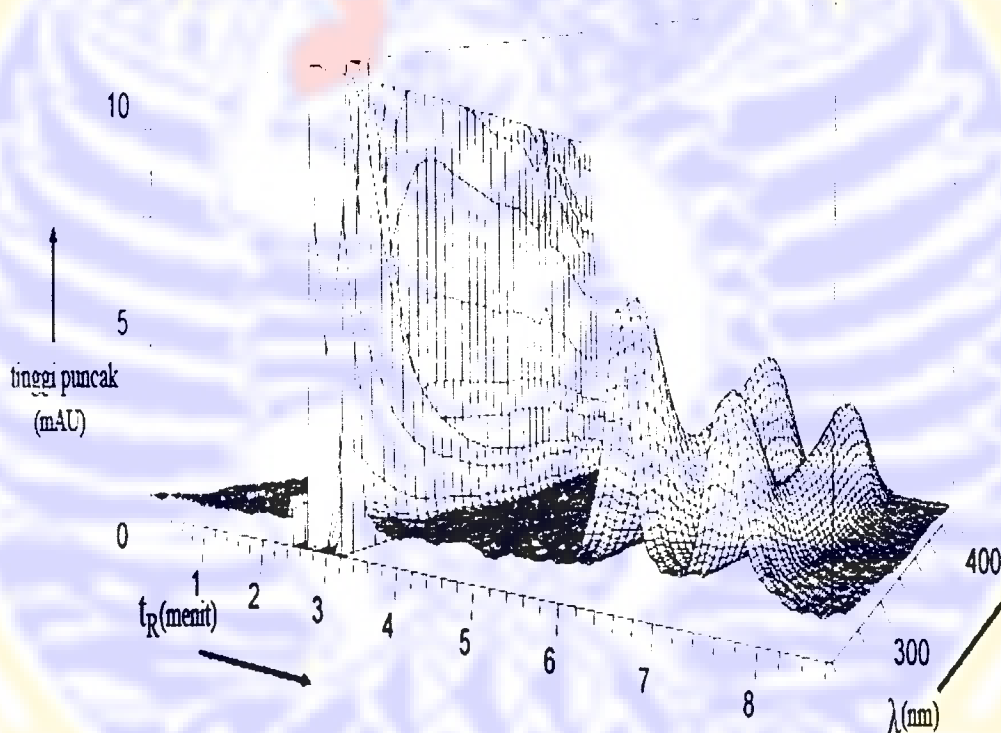
BAB V

HASIL PENELITIAN

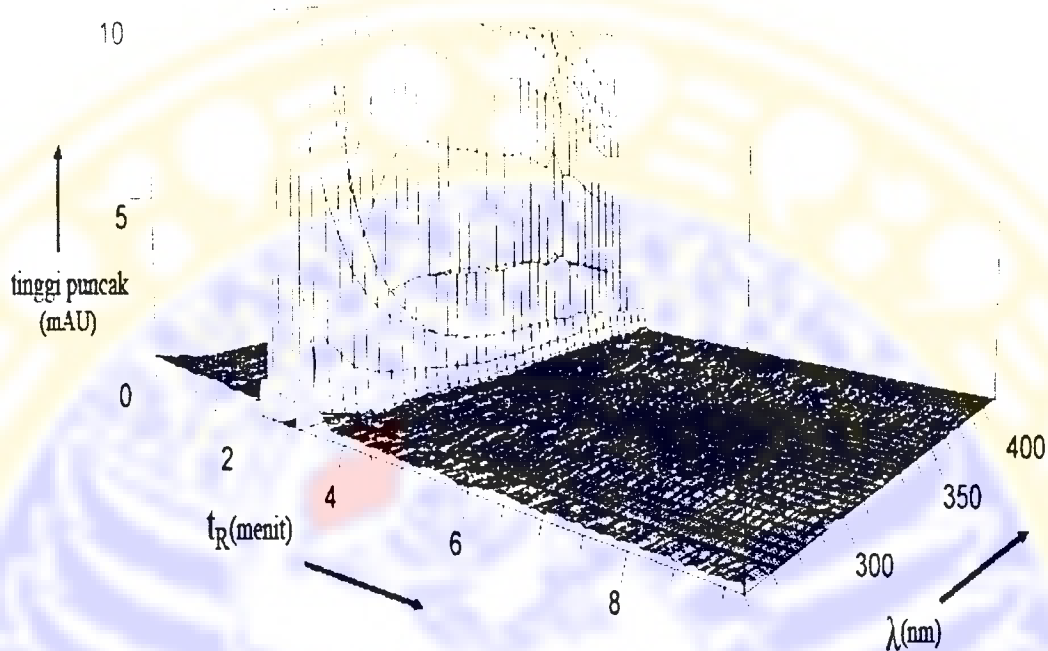
5.1 Optimasi Kondisi HPLC

5.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Pengamatan

Data penyuntikan metanol dan larutan standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin diamati spektra 3D-nya untuk menentukan panjang gelombang pengamatan oksitetrasiklin dan tetrasiklin, seperti terlihat pada gambar 5.1 dan 5.2.



Gambar 5.1 Spektrum 3D larutan campuran standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin

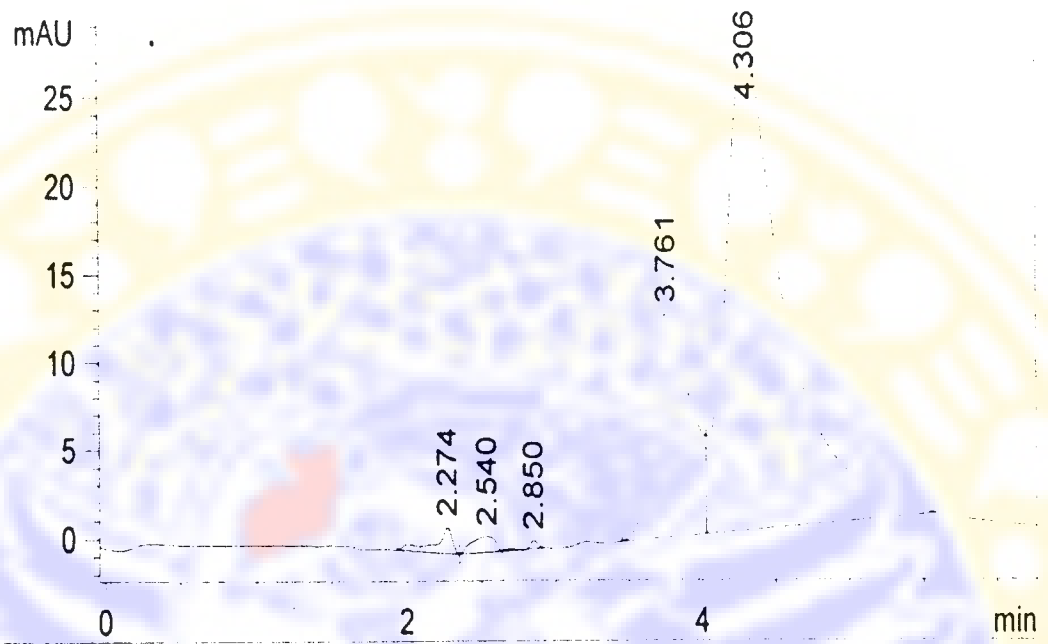


Gambar 5.2 Spektra 3D metanol

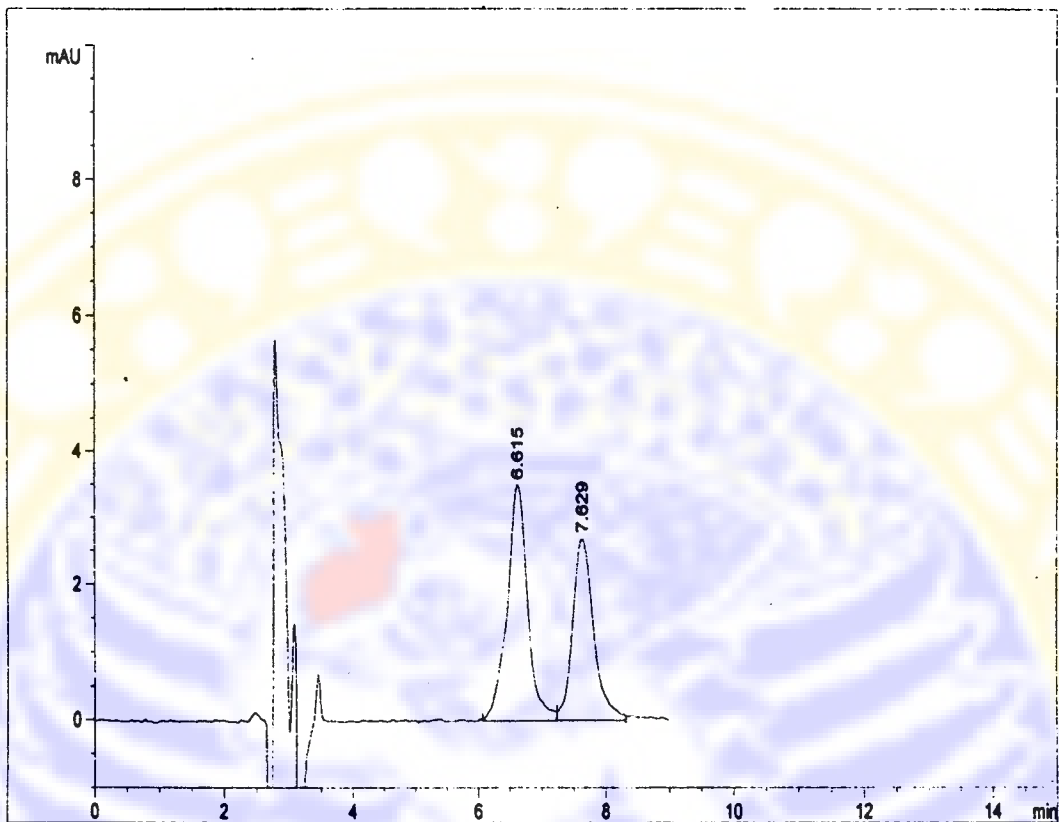
Pada panjang gelombang 365 nm pelarut metanol memberikan serapan sangat kecil dan penyuntikan larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada panjang gelombang 365 nm memberikan serapan (puncak) yang maksimum. Untuk selanjutnya digunakan panjang gelombang 365 nm sebagai panjang gelombang pengamatan oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

5.1.2 Pemilihan Kolom

Pada Penyuntikan larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan penggunaan dua jenis kolom yaitu Hypersil ODS C-18 5 μm , 4,6mm x 150mm dan Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm didapatkan data seperti pada gambar 5.3 dan 5.4 serta pada tabel V.1



Gambar 5.3 Kromatogram larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan kolom Hypersil ODS C-18 5 μm , 4,6mm x 150mm (t_R oksitetrasiklin = 3,761, t_R tetrasiklin = 4,306)



Gambar 5.4 Kromatogram larutan baku oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan kolom Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm (t_R oksitetrasiklin = 6,615, t_R tetrasiklin = 7,629)

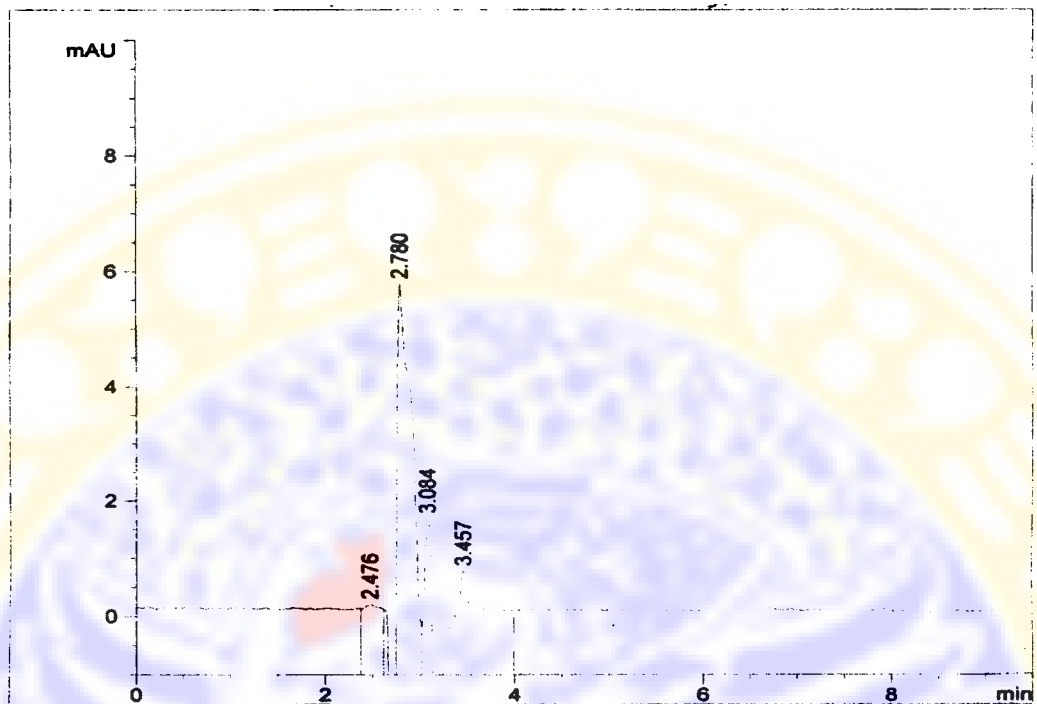
Tabel V.1 Harga α dan R_s oksitetrasiklin dan tetrasiklin antara kolom Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm dan Hypersil ODS C-18 5 μm , 4,6mm x 150mm

Kolom	t_r oksitetrasiklin (menit)	t_r tetrasiklin (menit)	Selektivitas (α)	Derajat Keterpisahan (R_s)
Hypersyl ODS C- 18 5 μm , 4,6mm x 150mm	3,761	4,306	0,94	1,14
Hypersil BDS C- 18 5 μm , 4,6mm x 250mm	6,615	7,629	1,15	1,87

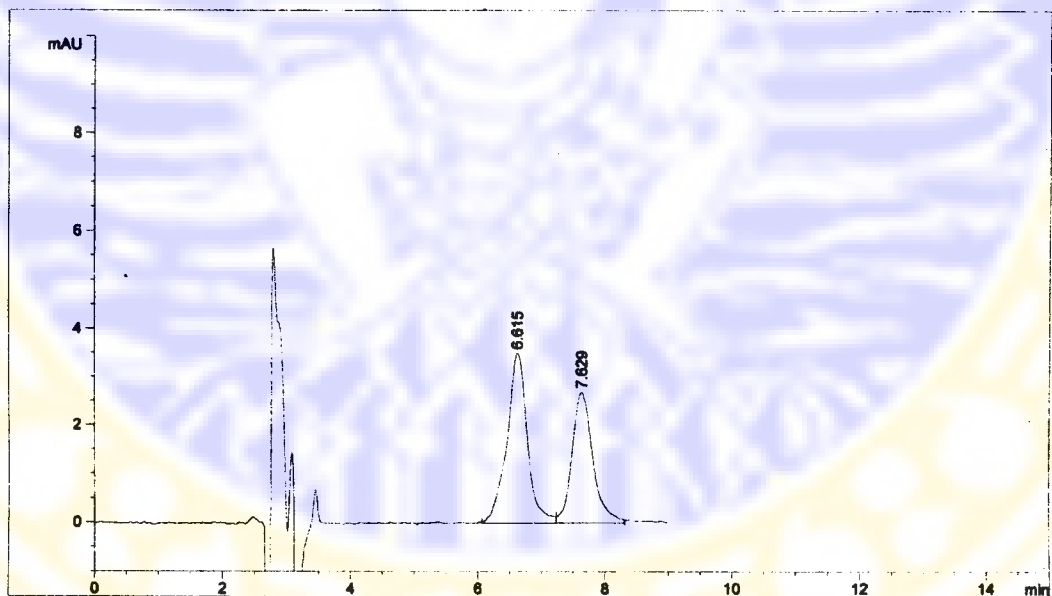
Untuk selanjutnya pada penelitian ini digunakan kolom Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm karena memiliki harga α dan R_s yang lebih besar dibandingkan dengan kolom Hypersil ODS C-18 5 μm , 4,6mm x 150mm.

5.1.3 Optimasi Kondisi HPLC

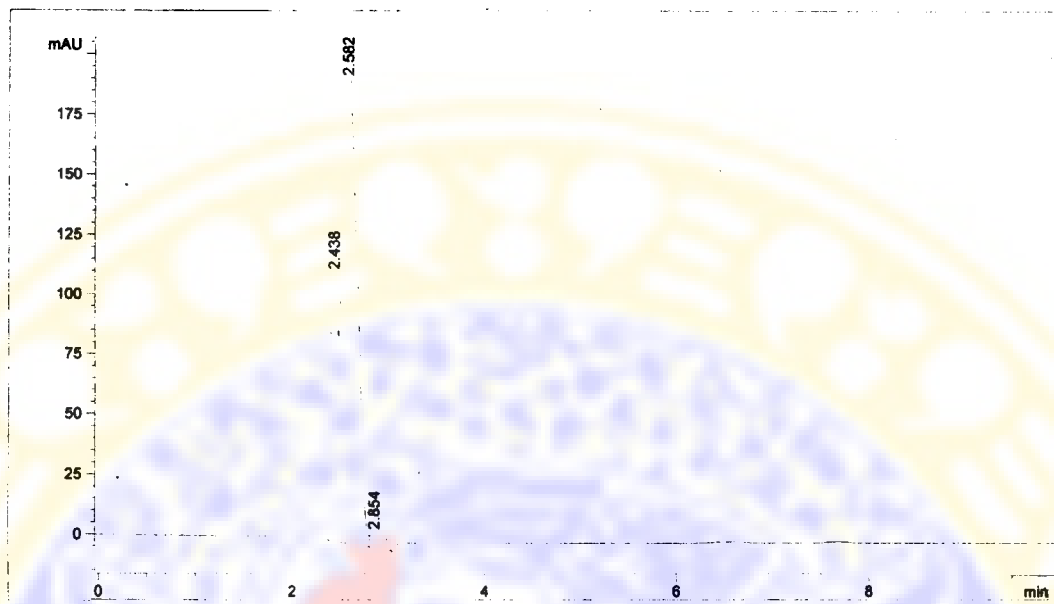
Pada penyuntikan metanol, larutan baku oksitetrasiklin dan tetrasiklin, sampel udang (hasil ekstraksi), dan sampel udang (hasil ekstraksi) yang mengandung oksitetrasiklin dan tetrasiklin ke dalam HPLC didapatkan data berturut-turut seperti pada Gambar 5.5, 5.6, 5.7, dan 5.8 dengan kondisi tersaji pada tabel V.2



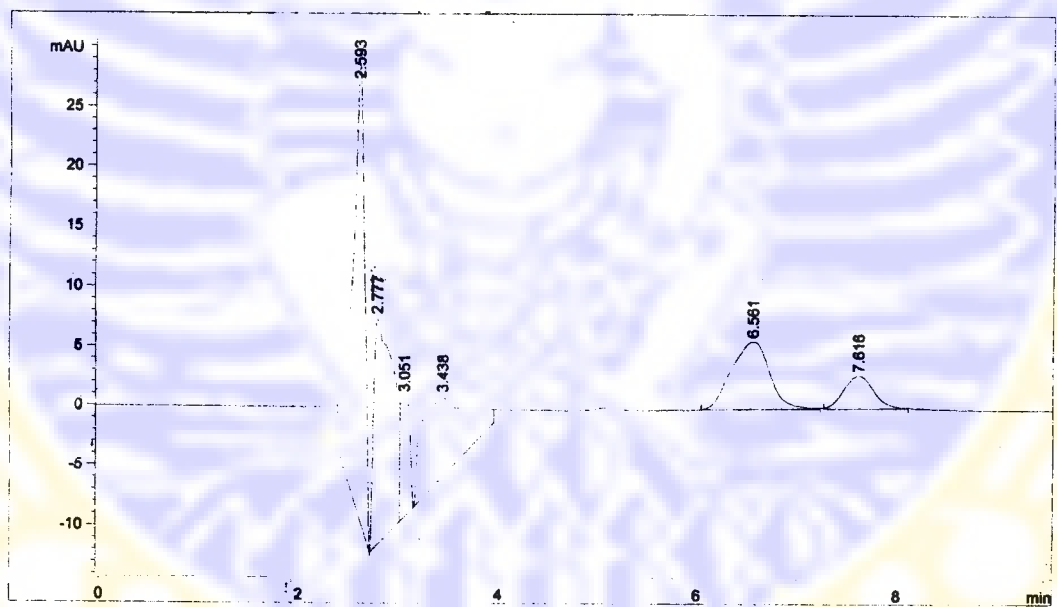
Gambar 5.5 Kromatogram metanol



Gambar 5.6 Kromatogram oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam pelarut metanol
(t_R oksitetrasiklin = 6,615, t_R tetrasiklin = 7,629)



Gambar 5.7 Kromatogram sampel udang (hasil ekstraksi) dalam pelarut metanol



Gambar 5.8 Kromatogram sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin ($t_R = 6,561$) dan tetrasiklin ($t_R = 7,616$)

Kromatogram pada Gambar 5.6 menunjukkan bahwa pada t_r oksitetrasiklin dan t_R tetrasiklin tidak didapatkan puncak-puncak pengganggu yang berasal dari pelarut metanol. Kromatogram pada Gambar 5.7 menunjukkan bahwa pada t_r oksitetrasiklin dan t_r tetrasiklin tidak didapatkan puncak-puncak pengganggu yang berasal dari komponen lain dalam sampel udang.

Tabel V.2 Kondisi *HPLC* untuk analisa oksitetrasiklin dan tetrasiklin

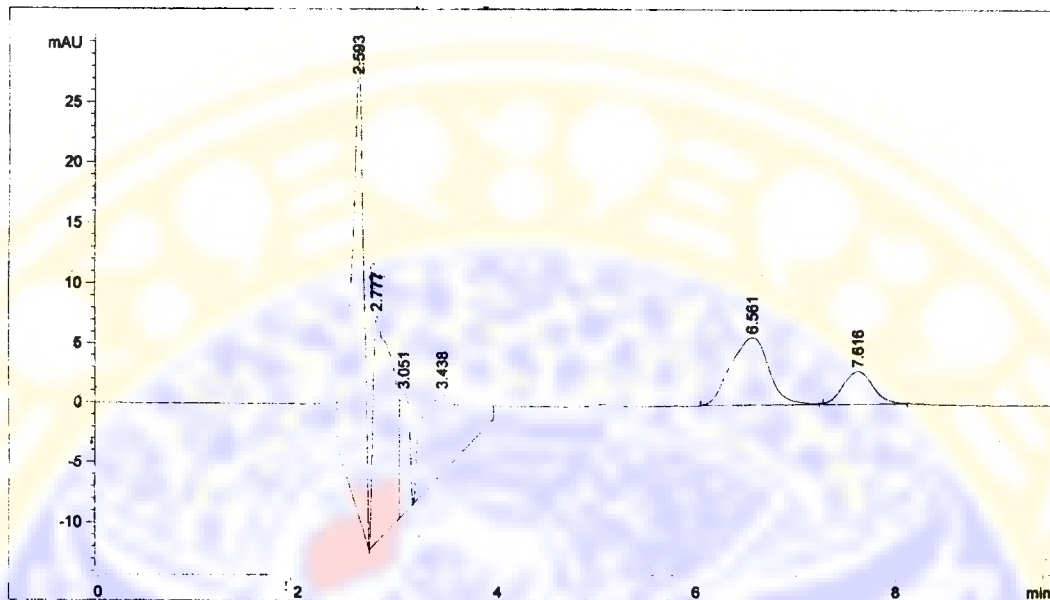
Parameter	Kondisi <i>HPLC</i>
Fase gerak	Metanol : Asetonitril : Asam oksalat 0,01M pH 2,5 (5 : 15 : 80)
Panjang gelombang	365 nm
Kolom	Hypersil BDS C-18 5 μ m, 4,6mm x 250mm
Aliran	1 mL/menit
Suhu	30 ⁰ C
Detektor	<i>Diode-Array Detector</i>
Mode	Isokratik
Volume Injeksi	100 μ L

Untuk analisa oksitetrasiklin dan tetrasiklin selanjutnya digunakan kondisi *HPLC* seperti pada tabel V.2.

5.2 Validasi Metode

5.2.1 Selektivitas

Dari hasil penyuntikan larutan sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin dan tetrasiklin diperoleh kromatogram *HPLC* serta harga α dan R_s puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin dan komponen lain dalam sampel. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel V.3 dan Gambar 5.9.



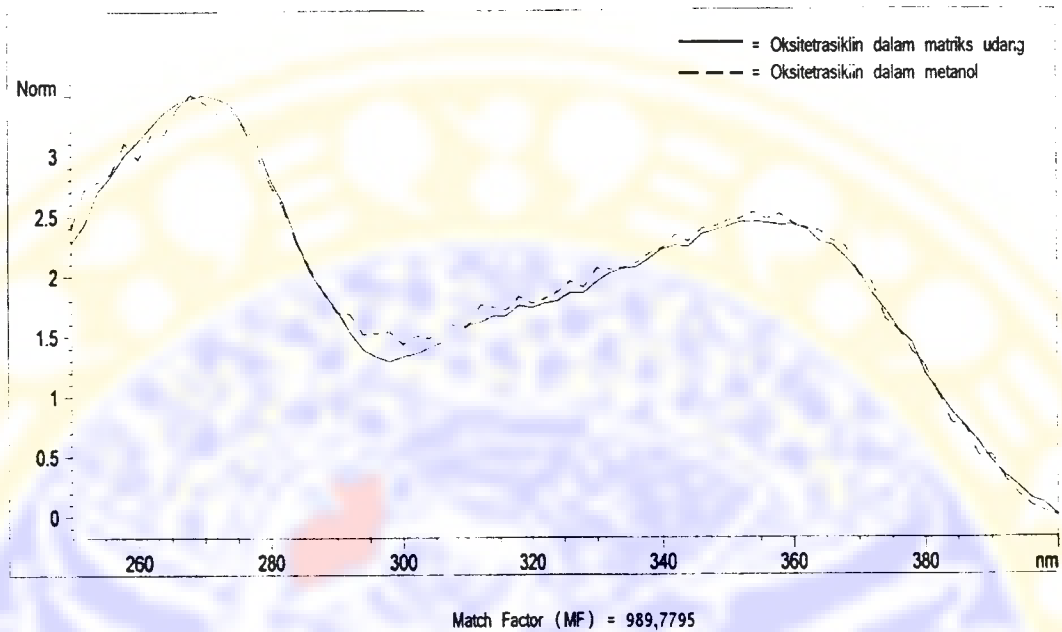
Gambar 5.9 Kromatogram *HPLC* standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam sampel udang

Tabel V.3 Data faktor selektivitas (α) dan Derajat Keterpisahan (R_s) puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin dan komponen lain dalam sampel

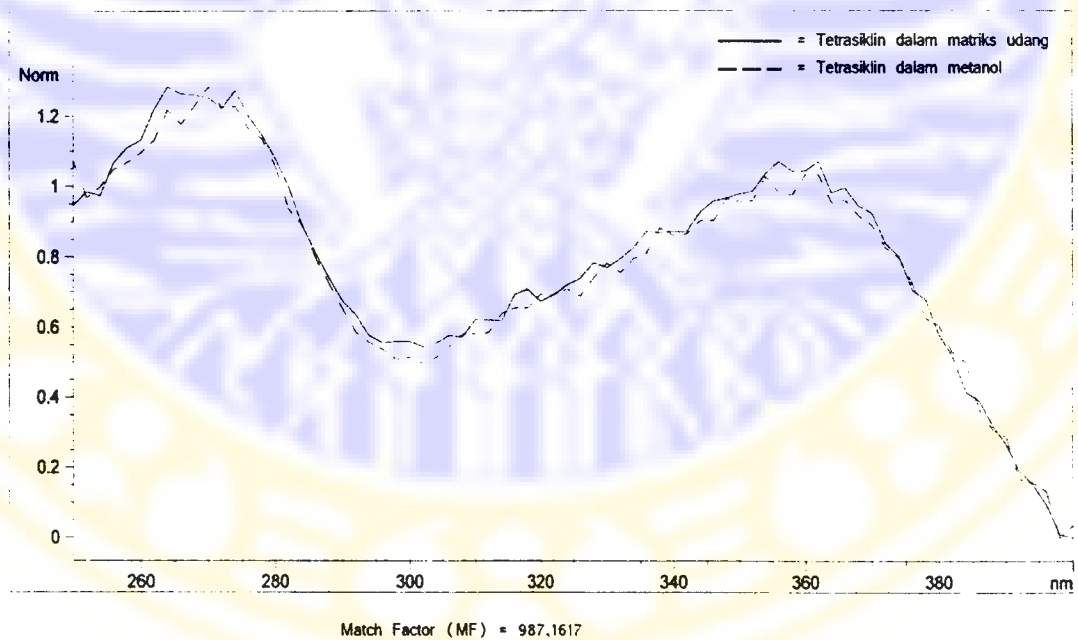
Pemisahan Puncak	α	R_s
Oksitetrasiklin $t_r = 6,651$ menit dengan komponen lain $t_r = 3,348$ menit	1,91	3.10
Oksitetrasiklin $t_r = 6,651$ menit dengan tetrasiklin $t_r = 7,616$ menit	1,16	1.65

Dari Gambar 5.9 dan Tabel V.3 dapat diketahui bahwa pemisahan puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin serta komponen-komponen lain dalam sampel udang memiliki harga $\alpha > 1$ dan $R_s > 1,5$.

Dari spektra antara standar oksitetrasiklin, tetrasiklin dan sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin dan tetrasiklin seperti pada Gambar 5.10 dan 5.11 diketahui bahwa antara oksitetrasiklin dan tetrasiklin standar dan dalam sampel memiliki profil yang sama dan dapat diamati pada panjang gelombang 365 nm.



Gambar 5.10 Spektra antara oksitetrasiklin standar dan oksitetrasiklin dalam sampel udang.



Gambar 5.11 Spektra antara tetrasiklin standar dan tetrasiklin dalam sampel udang

5.2.2 Linieritas

Hasil pengamatan dan penghitungan perbandingan area puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin terhadap lima macam kadar oksitetrasiklin dan tetrasiklin dapat dilihat pada Tabel V.4 dan Tabel V.5.

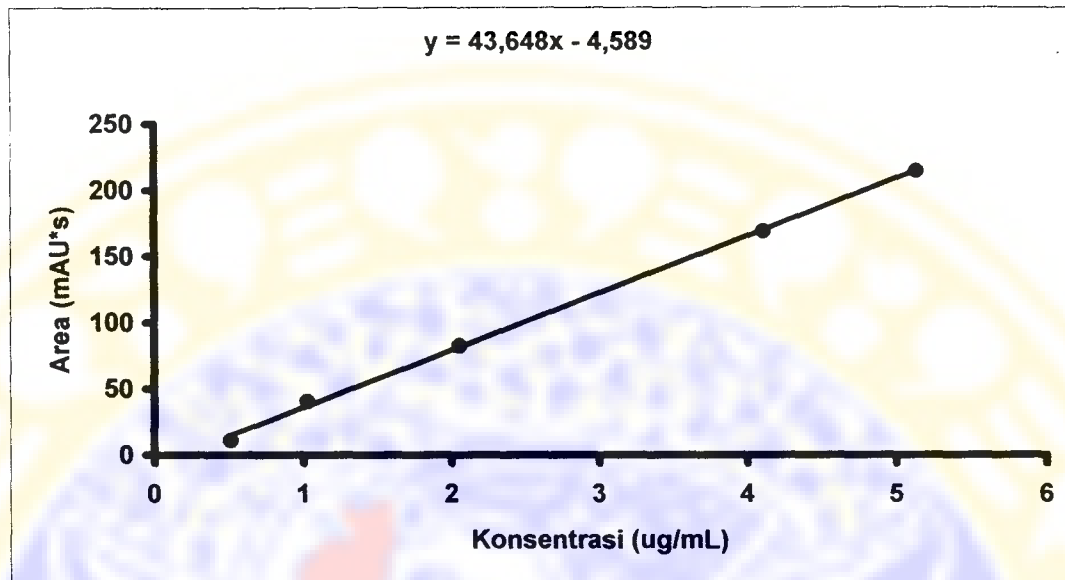
Tabel V.4 Data hubungan antara kadar oksitetrasiklin dengan area oksitetrasiklin.

NO	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU*s)
1.	0.514	11.04946
2.	1.028	40.53249
3.	2.056	82.58977
4.	4.112	169.33981
5.	5.140	214.54982
$r = 0.99919$		
$V_{x_0} = 2,786\%$		

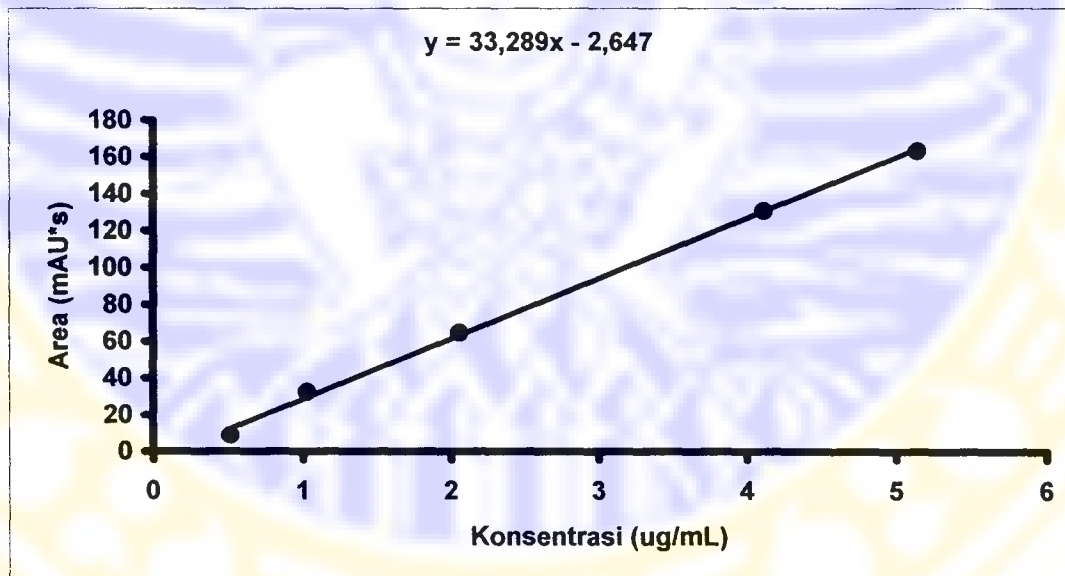
Tabel V.5 Data hubungan antara kadar tetrasiklin dengan area tetrasiklin.

NO	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU*s)
1.	0.514	8.77305
2.	1.029	32.56837
3.	2.058	64.67879
4.	4.116	130.83864
5.	5.145	163.37297
$r = 0.99913$		
$V_{x_0} = 3,585\%$		

Dari data diatas, maka dibuat kurva persamaan garis regresi antara kadar oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan area oksitetrasiklin dan tetrasiklin seperti pada Gambar 5.12 dan Gambar 5.13.



Gambar 5.12 Kurva persamaan garis regresi kadar oksitetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs Area oksitetrasiklin ($\text{mAU}\cdot\text{s}$).



Gambar 5.13 Kurva persamaan garis regresi tetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs Area tetrasiklin ($\text{mAU}\cdot\text{s}$).

Dari Tabel V.4 dan Gambar 5.12 diperoleh persamaan garis regresi standar oksitetrasiklin:

$$Y = 43,648X - 4,589 \text{ dengan } r_{\text{hitung}} = 0,99919 \text{ } V_{x_0} = 2,786\%$$

Dari Tabel V.5 dan Gambar 5.13 diperoleh persamaan garis regresi standar tetrasiklin:

$$Y = 33,289X - 2,467 \text{ dengan } r_{\text{hitung}} = 0,99913 \text{ } V_{x_0} = 3,585\%$$

Data tersebut menunjukkan bahwa ada hubungan linier antara kadar oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada rentang 0,514 – 5,14 $\mu\text{g/mL}$ dengan area oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

5.2.3 Batas Deteksi (*LOD*) dan Batas Kuantitasi (*LOQ*)

Untuk penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi, maka dibuat persamaan garis regresi antara kadar oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan tinggi puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin untuk mendapatkan harga slope (*s*). Dari percobaan yang dilakukan, diperoleh data linearitas seperti pada Tabel V.6 dan V.7 serta Gambar 5.14 dan 5.15

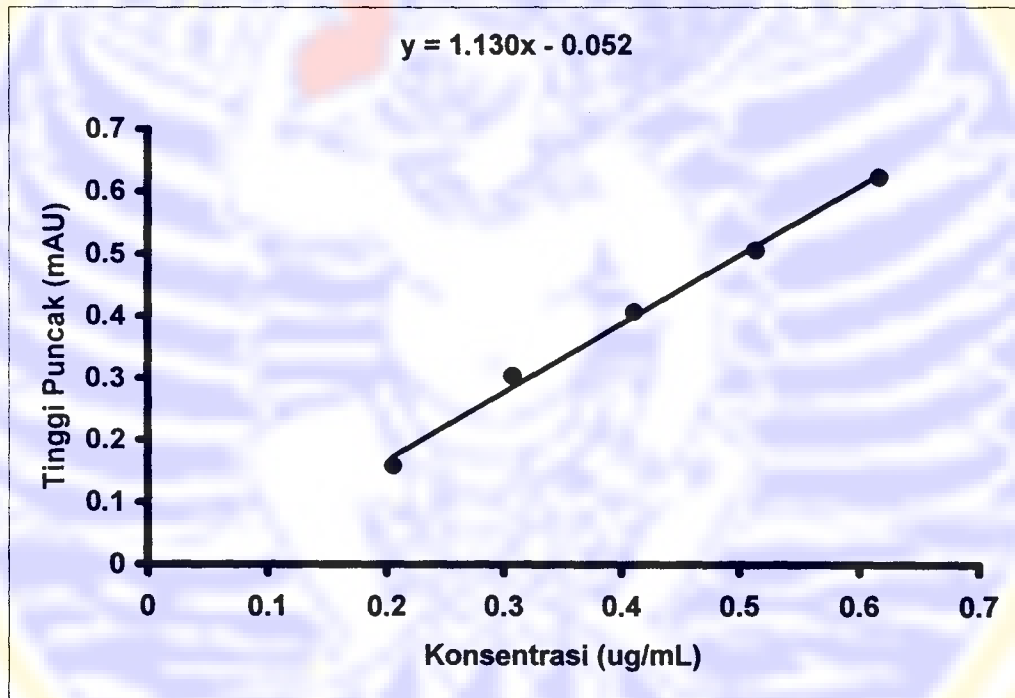
Tabel V.6 Data hubungan antara kadar oksitetrasiklin dengan tinggi puncak oksitetrasiklin untuk penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.

NO	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Tinggi Puncak (mAU)
1.	0.206	0.158550
2.	0.308	0.303931
3.	0.411	0.406585
4.	0.514	0.505724
5.	0.617	0.622608
$r = 0.9975$		

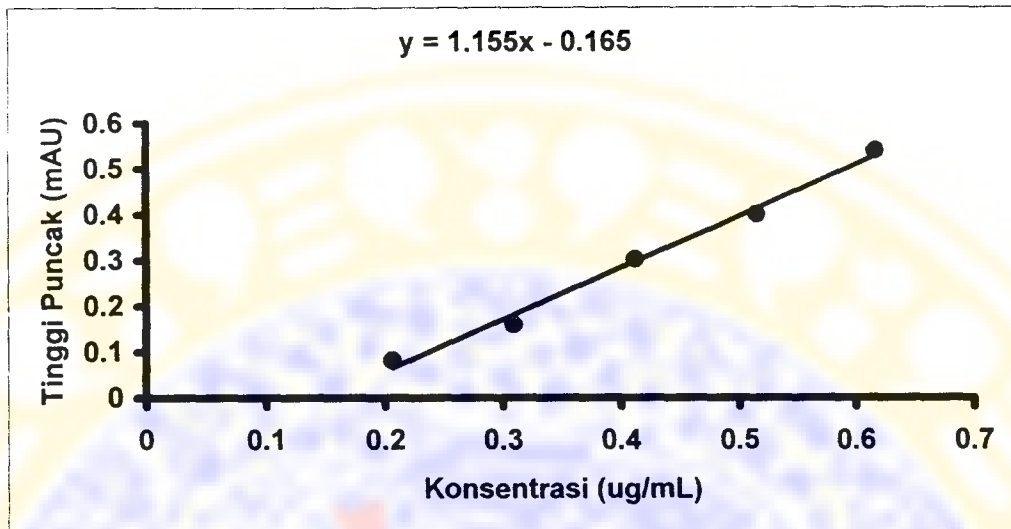
Tabel V.7 Data hubungan antara kadar tetrasiklin dengan tinggi puncak tetrasiklin untuk penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.

NO	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Tinggi Puncak (MAU)
1.	0.206	0.081893
2.	0.309	0.159575
3.	0.412	0.302682
4.	0.515	0.400202
5.	0.617	0.539059

$r = 0.9961$



Gambar 5.14 Kurva persamaan garis regresi kadar oksitetrasiklin ($\mu\text{g}/\text{mL}$) vs tinggi puncak (mAU).



Gambar 5.15 Kurva persamaan garis regresi kadar tetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs tinggi puncak (mAU).

Dari Tabel V.6 dan Gambar 5.14 diperoleh persamaan garis regresi oksitetrasiklin:

$$Y = 1,130X - 0,052 \text{ dengan } r_{\text{hitung}} = 0,9975$$

Dari Tabel V.7 dan Gambar 5.15 diperoleh persamaan garis regresi tetrasiklin:

$$Y = 1,155X - 0,165 \text{ dengan } r_{\text{hitung}} = 0,9961$$

Untuk mendapatkan harga Slope blank (S_b) ditentukan dengan menyuntikan metanol kedalam *HPLC*. Dari kromatogram didapatkan parameter puncak pengotor tertinggi (N_p) dan puncak pengotor terendah (p) untuk menghitung $S_b = \frac{N_p - p}{5}$ seperti pada Tabel V.8.

5

Tabel V.8 Data harga N_p , p , dan S_b

No.	Parameter	t_R (menit)	Tinggi Puncak (mAU)
1.	N_p	2,780	10,22833
2.	P	3,457	6,19744
$S_b = 0,80618$			

Dari data pada Tabel V.8 diperoleh harga $S_b = 0,80618$, untuk oksitetrasiklin didapatkan harga $LOD = 0,19 \mu\text{g/mL}$, $LOQ = 0,65 \mu\text{g/mL}$. Untuk tetrasiklin didapatkan harga $LOD = 0,13 \mu\text{g/mL}$, $LOQ = 0,43 \mu\text{g/mL}$.

5.2.4 Presisi (Kecermatan)

Untuk memperoleh data penentuan presisi dilakukan penyuntikan larutan baku campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan kadar yang sama ($2,06 \mu\text{g/mL}$) sebanyak 10 kali. Dari percobaan yang dilakukan diperoleh data seperti pada Tabel V.9 dan V.10.

Tabel V.9 Data hasil penentuan presisi oksitetrasiklin dengan kadar $2,06 \mu\text{g/mL}$

NO	t_r (menit)	Area(mAU*S)	Tinggi Area (mAU)
1.	6.625	77.81527	3.54866
2.	6.613	78.64854	3.59355
3.	6.615	78.73475	3.50776
4.	6.623	77.29390	3.55138
5.	6.633	77.01609	3.52365
6.	6.632	77.87105	3.52030
7.	6.624	78.93817	3.54934
8.	6.624	76.43529	3.49642
9.	6.623	78.68240	3.60982
10.	6.621	76.23480	3.50924
Rerata	6.623	77.767026	3.541012
SD	$3.31 \cdot 10^{-5}$	0.98280	0.0014
KV (%)	0.0005	1.26	0.04

Tabel V.10 Data hasil penentuan presisi tetrasiklin dengan kadar 2,06 µg/mL

NO	t_r (menit)	Area(mAU*S)	Tinggi Area (mAU)
1.	7.629	57.71626	2.65697
2.	7.627	59.58220	2.75450
3.	7.637	57.47132	2.64373
4.	7.638	58.90631	2.66834
5.	7.648	58.66113	2.65307
6.	7.645	57.63353	2.64305
7.	7.628	57.75154	2.68132
8.	7.626	59.45760	2.68726
9.	7.629	61.27688	2.68433
10.	7.618	62.09816	2.74884
Rerata	7.632	59.055493	2.68214
SD	$8.63 \cdot 10^{-5}$	2.53716	$1.60 \cdot 10^{-3}$
KV (%)	$1.1 \cdot 10^{-3}$	4.30	0.06

Berdasarkan Tabel V.9 maka presisi penyuntikan oksitetrasiklin mempunyai harga KV = 0,0005% (untuk waktu tambat oksitetrasiklin), KV = 1,26% (untuk area puncak oksitetrasiklin), KV = 0,04% (untuk tinggi puncak oksitetrasiklin). Berdasarkan Tabel V.10 untuk tetrasiklin didapatkan harga KV = 0,0011% (untuk waktu tambat tetrasiklin), KV = 4,30% (untuk tinggi puncak tetrasiklin), KV = 0,06% (untuk tinggi puncak tetrasiklin).

5.2.5 Akurasi Dan Presisi Metode

5.2.5.1 Penentuan Susut Pengeringan Udang

Pengeringan udang dilakukan pada suhu 50°C selama 24 jam, menghasilkan data seperti pada Tabel V11.

Tabel V11 Susut pengeringan udang

NO	Berat basah (g)	Berat kering (g)	Susut Pengeringan (%)
1.	100.256	20.180	79.872
2.	100.092	20.016	80.002
3.	100.053	19.510	80.500
4.	100.021	18.906	81.098
Rerata	100.106	19.653	80.638

5.2.5.2 Pemilihan Eluen KLT

Penerapan kondisi KLT hasil studi pustaka untuk menghasilkan noda oksitetrasiklin dan tetrasiklin dapat dilihat pada Tabel V.12

Tabel V.12 Hasil optimasi eluen KLT

Eluen	Rf
Metanol : Asetronitril (1:1)	0,10
Metanol : Asetronitril (3:1)	0,26
Metanol : Asetronitril (4:1)	0,29
Metanol : Asetronitril (5:1)	0,24
Kloroform : Metanol (10:1)	0 (tidak terelusi)

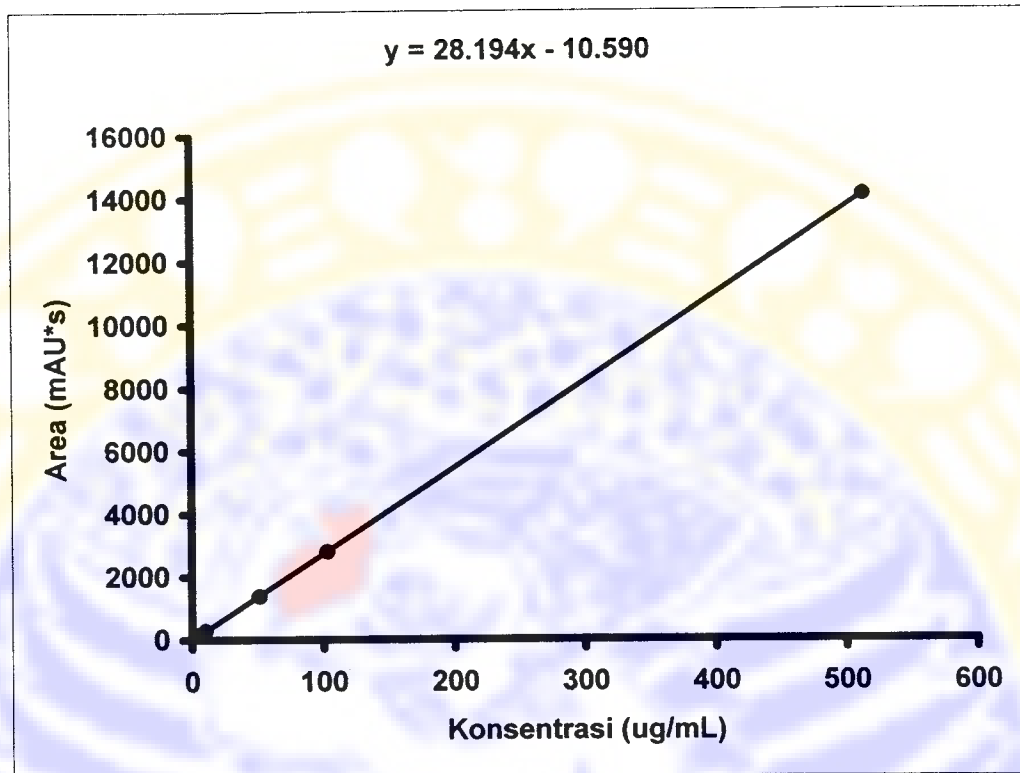
Dari data di atas maka untuk KLT-Preparatif digunakan eluen Metanol : Asetronitril (4:1) yang menghasilkan harga Rf = 0,29, dengan sinar UV sebagai penampak noda.

5.2.5.3 Akurasi Dan Presisi

Untuk penentuan persen perolehan kembali adisi oksitetrasiklin dan tetrasiklin ke dalam sampel udang diperlukan persamaan garis regresi pada rentang yang sesuai dengan konsentrasi yang diadiskan kedalam udang seperti pada Tabel V.13, V.14 dan kurva linearitas pada Gambar 5.16 dan 5,17

Tabel V.13 Data hubungan antara konsentrasi oksitetrasiklin standar dengan area oksitetrasiklin untuk penentuan persen perolehan kembali

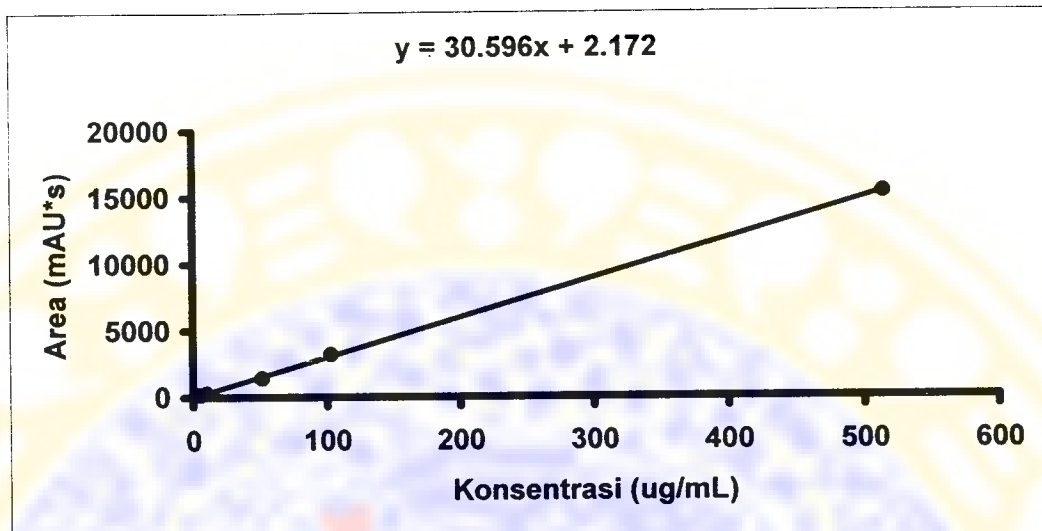
No.	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU*s)
1.	5.14	147.99188
2.	10.28	282.39325
3.	51.40	1370.81995
4.	102.80	2792.05933
5.	514.00	14092.10000
$r = 0,99999$		



Gambar 5.16 Kurva dan persamaan garis regresi kadar oksitetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs Area oksitetrasiklin (mAU*s) untuk penentuan persen perolehan kembali

Tabel V.14 Data hubungan antara kadar tetrasiklin dengan area tetrasiklin untuk penentuan persen perolehan kembali

No.	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU*s)
1.	5.15	159.61198
2.	10.29	297.66223
3.	51.45	1407.04150
4.	102.90	3212.31494
5.	514.50	15282.70000
$r = 0,99989$		



Gambar 5.17 Kurva dan persamaan garis regresi kadar tetrasiklin ($\mu\text{g/mL}$) vs Area tetrasiklin (mAU*s) untuk penentuan persen perolehan kembali

Data akurasi dan presisi metode dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dapat dilihat pada Tabel V.15 dan V.16

Tabel V.15 Akurasi dan presisi metode dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE* untuk oksitetrasiklin

Replikasi	Persen Perolehan Kembali			
	KLT-Preparatif		<i>SPE</i>	
	Area (mAU*s)	% Recovery	Area (mAU*s)	% Recovery
1.	130.45622	0.36	157.74860	46.71
2.	131.63699	0.37	159.32526	47.28
3.	134.67546	0.38	155.60411	45.93
4.	135.56953	0.39	153.20909	45.07
Rerata	133.08455	0.38	156.47174	46.25
SD	5.90	$2 \cdot 10^{-4}$	7.06	0.92
KV (%)	4.44	0.05	4.51	1.99

Tabel V.16 Akurasi dan presisi metode dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE* untuk tetrasiklin

Replikasi	Persen Perolehan Kembali			
	KLT-Preparatif		<i>SPE</i>	
	Area (mAU*s)	% Recovery	Area (mAU*s)	% Recovery
1.	130.69196	0.91	60.52843	69.86
2.	130.98721	0.91	62.09058	70.34
3.	132.87457	0.92	61.07826	70.03
4.	135.65909	0.93	59.20662	69.46
Rerata	132.55341	0.92	60.71597	69.92
SD	5.22	1 . 10⁻⁴	1.45	0.13
KV (%)	3.94	0.01	2.38	1.92

5.3 Analisis Data Statistik

Data yang diperoleh pada Tabel V.15 dan V.16 dianalisa dengan Uji t dua sampel ekuivalen yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel V.17 dan V.18

Tabel V.17 Data persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE*

Replikasi	Persen Perolehan Kembali			
	Oksitetrasiklin		Tetrasiklin	
	KLT- Preparatif	<i>SPE</i>	KLT- Preparatif	<i>SPE</i>
1.	0.36	46.71	0.91	69.86
2.	0.37	47.28	0.91	70.34
3.	0.38	45.93	0.92	70.03
4.	0.39	45.07	0.93	69.46

Tabel V.18 Tabel hasil uji t persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang hasil preparasi dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE*

Hasil uji	Oksitetrasiklin	Tetrasiklin
df	3	3
Sig. (2-tailed)	0,000	0,000
t hitung	94,452	368,716

Berdasarkan Tabel V.18 dalam $\alpha = 0,05$ didapatkan harga P untuk oksitetrasiklin dan tetrasiklin = 0,000. Hal ini berarti terdapat perbedaan bermakna antara pemisahan secara KLT-Preparatif dengan *SPE* pada udang dengan metode *HPLC*.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian analisis residu oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam udang menggunakan metode *HPLC* ini ditekankan pada tahapan preparasi sampel dengan proses pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE*.

Pada penelitian ini menggunakan dua jenis kolom yang berbeda yaitu: Hypersyl ODS C-18 5 μm , 4,6mm x 150mm dan Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kolom Hypersil ODS C-18 5 μm , 4,6mm x 150mm memberikan pemisahan yang buruk karena memiliki harga $\alpha < 1$ dan $R_s < 1,5$ oleh karena itu dipilih kolom Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm yang memberikan pemisahan yang baik karena memiliki harga $\alpha > 1$ dan $R_s > 1,5$. Perbedaan harga α dan R_s dikarenakan perbedaan panjang antara kolom Hypersyl BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm dan Hypersil ODS C-18 5 μm , 4,6mm x 150mm.

Penentuan panjang gelombang pengamatan oksitetrasiklin dan tetrasiklin dilakukan dengan pengamatan spektra kromatogram pada panjang gelombang antara 250 – 400 nm, pengamatan dilakukan dengan membandingkan spektra kromatogram eluen (metanol) dan spektra kromatogram oksitetrasiklin dan tetrasiklin, sehingga diperoleh panjang gelombang yang dapat dipakai untuk analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang tidak diganggu oleh puncak area pelarut (metanol) ataupun oleh pengotor yang lain. Dari hasil optimasi panjang gelombang dipilih 365 nm sebagai panjang gelombang pengamatan puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

Untuk mendapatkan kondisi *HPLC* yang dapat memisahkan antara oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan eluen (metanol) ataupun dengan komponen lain dalam sampel udang dilakukan penyuntikan metanol, larutan standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin, blanko udang, dan standar dalam sampel udang. Pada penelitian ini didapatkan kondisi optimal yang terpilih untuk analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan *HPLC*, meliputi fase diam kolom Hypersil BDS C-18 5 μm , 4,6mm x 250mm, fase gerak metanol : asetonitril : 0.01 M :

asam oksalat pH 2,5 = 5 : 15 : 80 (v/v/v), aliran 1,0 mL / menit, dan dengan detektor *diode array*, dengan mode isokratik.

Penentuan kesahihan metode dilakukan dengan validasi metode yang meliputi penentuan selektivitas, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, presisi, serta akurasi dan presisi metode.

Dilakukan penyuntikkan matrik sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin dan tetrasiklin kedalam *HPLC* untuk mengetahui harga selektivitas (α) dan derajat keterpisahan (R_s) antara puncak komponen matrik udang dengan puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin. Dari percobaan diperoleh harga $\alpha = 1,91$ dan $R_s = 3,10$ yang berarti bahwa antara puncak-puncak komponen lain dalam udang dengan puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin dapat dibedakan dan terpisah dengan baik. Sebelum dilakukan penyuntikkan matrik udang yang mengandung oksitetrasiklin dan tetrasiklin perlu dilakukan penyuntikkan matrik udang yang tidak mengandung oksitetrasiklin dan tetrasiklin kedalam *HPLC* sebagai blanko untuk mengetahui pada waktu tambat oksitetrasiklin dan tetrasiklin tidak didapatkan puncak pengganggu yang berasal dari komponen matrik udang. Dari data yang diperoleh dapat diketahui bahwa waktu tambat oksitetrasiklin dan tetrasiklin tidak didapatkan adanya puncak komponen lain pada matrik udang.

Pada penentuan linearitas dari kurva baku, diperoleh persamaan regresi $y = 43,648x - 4,589$ dengan harga $r = 0,99919$, $V_{x_0} = 2,786\%$ untuk oksitetrasiklin dan $y = 33,289x - 2,657$ dengan harga $r = 0,99913$, $V_{x_0} = 3,585\%$ untuk tetrasiklin. Dari data diatas diketahui dari harga r hitung dan V_{x_0} kurang dari 5% menunjukkan bahwa ada hubungan linier antara konsentrasi oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada rentang 0,5 – 5 $\mu\text{g/mL}$ terhadap puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin (mAU*s).

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan menyuntikkan standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin sampai dengan konsentrasi terkecil yang tidak memberikan respon tanggap detektor. Pada penyuntikkan secara manual disuntikkan standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan rentang konsentrasi 0,2 – 0,6 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diamati dan dibuat kurva linieritas antara konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) terhadap tinggi puncak oksitetrasiklin dan tetrasiklin (mAU). Diperoleh data persamaan linieritas $y = 1,130x - 0,052$ dengan $r_{\text{hitung}} = 0,9975$

untuk oksitetrasiklin dan $y = 1,155x - 0,165$ dengan $r_{hitung} = 0,9961$. Dari hasil pengolahan data didapatkan harga batas deteksi (*LOD*) untuk oksitetrasiklin = 0,19 $\mu\text{g/mL}$, untuk tetrasiklin = 0,13 $\mu\text{g/mL}$ dan batas kuantitasi (*LOQ*) untuk oksitetrasiklin = 0,65 $\mu\text{g/mL}$, untuk tetrasiklin = 0,43 $\mu\text{g/mL}$.

Penentuan presisi alat dilakukan dengan penyuntikan standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin secara manual sebanyak 10 kali dengan konsentrasi 2,06 $\mu\text{g/mL}$ dan diperoleh data KV sebagai parameter presisi untuk waktu tambat (t_R) untuk oksitetrasiklin = 0,0005%, untuk tetrasiklin = 0,0011%, area puncak oksitetrasiklin = 1,26%, tetrasiklin = 4,30%, dan tinggi puncak oksitetrasiklin = 0,04%, tetrasiklin = 0,06%. Dari data KV diatas dapat diketahui bahwa nilai presisi analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan *HPLC* memenuhi persyaratan yaitu $< 10\%$ (Readnour, 2003).

Untuk penentuan akurasi dilakukan dengan penentuan persen perolehan kembali dengan teknik adisi standar oksitetrasiklin dan tetrasiklin ke dalam matriks udang. Prosedur ekstraksi dilakukan dengan menggunakan udang basah = 100 g untuk metode KLT-Preparatif dan 20 g untuk metode *SPE*. Untuk metode KLT-Preparatif diperlukan percobaan untuk mendapatkan berat udang kering setelah pengeringan 50⁰C selama 24 jam. Dari percobaan didapatkan berat rata-rata udang kering = 19,653 g untuk rata-rata penimbangan udang basah seberat =100,106 g sehingga untuk tahapan untuk penentuan persen perolehan kembali menggunakan KLT-Preparatif dilakukan dengan adisi oksitetrasiklin dan tetrasiklin pada sampel kering seberat $\pm 19,653$ g untuk setiap replikasi. Dari percobaan tersebut juga didapatkan data susut pengeringan sampel udang dengan suhu 50⁰C selama 24 jam adalah 80,638%. Pada penelitian ini akan dibandingkan harga persen perolehan kembali antara ekstraksi sampel dengan tahapan pemisahan secara KLT-Preparatif dengan *SPE*.

Untuk preparasi sampel secara KLT-Preparatif perlu dilakukan optimasi eluen untuk KLT. Eluen yang dioptimasi adalah metanol : asetonitril masing-masing dengan perbandingan (1:1), (3:1), (4:1), (5:1) selain itu juga dilakukan optimasi untuk eluen kloroform : metanol dengan perbandingan (10:1). Dari optimasi eluen tersebut didapatkan data bahwa eluen metanol : asetonitril (4:1) memberikan hasil elusi yang lebih baik dibandingkan dengan eluen yang lain

dengan harga $R_f = 0,29$ sehingga eluen metanol : asetonitril dengan perbandingan (4:1) digunakan sebagai eluen untuk KLT-Preparatif.

Pada pemisahan secara KLT-Preparatif perlu dilakukan penghilangan lemak dan komponen-komponen lain dalam udang dengan n-Heksana agar tidak mengganggu proses pemisahan secara KLT-Preparatif, untuk penarikan campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin dari udang digunakan metanol sebagai pelarut pengeksrak oksitetrasiklin dan tetrasiklin. Untuk pemisahan secara *SPE* proses pemisahan oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan komponen-komponen lain dalam udang dilakukan secara bersamaan pada *SPE* dengan pelarut metanol. Sebelum dimasukkan kedalam *SPE* udang diekstraksi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan 0,1 M *EDTA-McIllvaine* buffer untuk menarik campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin kemudian dimasukkan ke dalam *SPE* untuk memisahkan dengan komponen-komponen lain.

Dari penentuan persen perolehan kembali didapatkan persen perolehan kembali secara KLT-Preparatif untuk oksitetrasiklin = 0,38% dengan harga KV = 0,05% untuk tetrasiklin = 0,92% dengan harga KV = 0,01%, sedangkan untuk proses pemisahan secara *SPE* diperoleh data persen perolehan kembali untuk oksitetrasiklin = 46,25% dengan harga KV = 1,99% untuk tetrasiklin = 69,92% dengan harga KV = 1,92%. Rendahnya persen perolehan kembali yang dihasilkan dikarenakan oksitetrasiklin dan tetrasiklin terikat kuat pada matriks udang sehingga pada proses akhir ekstraksi masih banyak oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang tertinggal pada matrik udang, selain itu proses ekstraksi yang panjang menyebabkan oksitetrasiklin dan tetrasiklin banyak yang hilang selama proses ekstraksi.

Untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE* dilakukan uji t (Paired t-test). Harga yang diperoleh P value untuk oksitetrasiklin = 0,000 dan untuk P value tetrasiklin = 0,000 lebih kecil dari $P \alpha = 0,05$. Oleh karena itu berarti ada perbedaan bermakna antara persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin dengan pemisahan secara KLT-Preparatif dan *SPE*, Perbedaan tersebut dikarenakan proses kerja ekstraksi pemisahan secara KLT-Preparatif memerlukan waktu dan rangkaian kerja yang

panjang sehingga didapatkan perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang lebih kecil jika dibandingkan dengan pemisahan secara *SPE* yang memiliki waktu dan rangkaian kerja lebih pendek.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Kondisi optimum *HPLC* untuk analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin tercapai dengan eluen metanol : asetonitril : 0,01M asam oksalat (5:15:80); kolom Hypersil BDS 5 μm , 250 mm x 4,6 mm, pengamatan pada panjang gelombang 365 nm, suhu 30⁰C, kecepatan alir 1 mL/menit, dan dengan detektor *diode-array*. Waktu tambat oksitetrasiklin = 6,623 menit, KV= 0,0005%, waktu tambat tetrasiklin = 7,632 menit, KV = 0,0011%
2. Presisi (KV) oksitetrasiklin dan tetrasiklin berturut-turut adalah sebagai berikut : 1,26%, 4,30%; metode analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin menghasilkan harga koefisien korelasi (r) untuk oksitetrasiklin dan tetrasiklin berturut-turut adalah sebagai berikut : 0,99919, 0,99913; batas deteksi (*LOD*) oksitetrasiklin dan tetrasiklin berturut-turut adalah sebagai berikut : 0,19 $\mu\text{g/mL}$, 0,13 $\mu\text{g/mL}$; batas kuantitasi (*LOQ*) oksitetrasiklin dan tetrasiklin berturut-turut adalah sebagai berikut : 0,65 $\mu\text{g/mL}$, 0,43 $\mu\text{g/mL}$.
3. Persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin secara KLT-Preparatif berturut-turut adalah sebagai berikut : 0,38%, 0,92%; persen perolehan kembali oksitetrasiklin dan tetrasiklin secara *SPE* berturut-turut adalah sebagai berikut : 46,25%, 69,92%; dari data hasil uji t (paired) didapatkan adanya perbedaan bermakna persen perolehan kembali yang diperoleh secara *SPE* dengan KLT-Preparatif.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, disarankan agar analisis oksitetrasiklin dan tetrasiklin dalam undang secara *HPLC* menggunakan metode pemisahan secara *SPE* karena memiliki harga persen perolehan kembali yang jauh lebih baik, dan prosedur ekstraksi yang lebih cepat dibandingkan dengan pemakaian metode pemisahan secara KLT-Preparatif

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1993, Statutory Instrument 1993 No. 990, *The Animal, Meat and Meat Product* (Examination for Residues and Maximum Residue Limit) (Amendment) Regulation <http://www.foodmarket.com>, diakses Januari 2003.
- Anonim, 2002, *Udang Asia Dihadang Komisi Uni-Eropa*, Kompas, Senin 22 Januari 2002.
- Anonim, 2001 *European Pharmacopoeia*, Fourth Ed., vol II, Council of Europe, Strasborg, p 1694-1695
- Anonim, 1999, *Oxytetracycline Residues in Cultured White Shrimp Tissue by HPLC and a Microbial Receptor Assay*, Journal of food science <http://www.wws.princeton.edu/cgi-bin/byteserv.prlota/disk3/1979/7905/790503.PDF>, diakses Januari 2003.
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia*, edisi IV, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, p 639, 778.
- Ahuja, S., 1996, *Trace and Ultratrace Analysis by HPLC*, volume 115, A Wiley Interscience Publication, New York, pp 351.
- Carr G. P., Wahlich, 1990, *A Practical Approach to Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 8, p.613-618.
- Gearin J. E., Garbowski B. F., 1969. *Methods of Drug Analysis*, Lea and Febinger, Philadelphia, p.247-251.
- Gafner J. L., 1999. *Identification and Semiquantitative Estimation of Antibiotics Added to Complete Feeds, Premixes, and Concentrate*, Swiss Federal Research for Animal Production, Analytical Section, Microbiology Service, J.A.O.A.C. 82, 1-8.
- Horwitz, W., 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, volume 2, ch 23, pp 20-23.
- Indrayanto, G., 1994, *Validasi Metode Pada Analisis dengan Kromatografi*, Laboratorium Bioteknologi Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

- Kochansky, J., 2000, *Analysis of Oxytetracycline in Extender Patties*, USDA ARS Bee Research Laboratory, Building 476, 10300 Baltimore Ave., Beltsville, MD 20705-2350, USA.
- Martindale, 1982. *The Extra Pharmacopoeia* 28th Ed, Pharmaceutical Press, London, pp 259, 285-286.
- Macek K., 1972. *Pharmaceutical Applications of Thin Layer and Paper Chromatography*, Elsevier Publishing Company, New York, p.32.
- Markakis, P.K., 1996, *Microbiological Method for Determining Macrolides in Animal Feeds in The Presence of Other Drugs by Thin Layer Chromatography Detection*, Aristotle Univ. Sch. Of Vet. Med, Lab. Of. Animal Nutr. 540 06 Thesaloniki, Greece, J.A.O.A.C. 79, 375-379, 1263-1268.
- Mary C.C, Deepali. P, Julie. B, Graham. B., 2001, *Determination of Oxytetracycline Residues in Matrice (Trout, Biofilter Sand, Sediment, Water) from a Freshwater Recirculating Aquaculture System*, <http://www.ksu.edu/wgrc/Protocols/ISH/GISH.pdf> www.ksu.edu/wgrc/Protocols/ISH/GISH.pdf
- Meyer J., *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Second Edition, 1953, Iowa.
- Mulya. M dan Suharman, 1995. *Analisis Instrumental*, Airlangga University Press.
- Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., MacNeil, J.D., 1995, *CHEMICAL ANALYSIS for Antibiotic used in Agriculture*, AOAC International, USA, p 333-400
- Readnour, R. S., 2000, *Sampling And Analysis Of Foodstuff From Animal Origin*, Eli Lilly And Company, Greenfield, IN, USA, p. 300-321.
- Setyabudi, R., dan Kunardi, L., 1995. Golongan tetrasiklin dan kloramfenikol, Sulistia G. Ganiswara (Eds). *Farmakologi dan Terapi*, edisi 4, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, pp 651-656
- Skoog D. A., 1986. *An Introduction to Chromatographic Separation, Principal Instrumental Analysis*, John Wiley & Sons, p.727-753.

- Soetomo H. A., 1990. *Teknik Budidaya Udang Windu*, Cetakan Pertama, Sinar Baru, Bandung.
- Touchstone J. C., Dobbing M. F., 1983. *Practice of Thin Layer Chromatography*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, p. 4-14,251-270.
- Tissue, B. M., 2000, *Solid Phase Extraction*, <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/extract/>, diakses februari 2003.
- Walsh, C., 2000, *Molecular Mechanism That Confer Antibacterial Drug Resistance*, Biological Chemistry and Molecular Pharmacology Department, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02116, USA

Lampiran 1

Perhitungan Selektivitas (α) Dan Derajat Keterpisahan (R_s)

Rumus yang digunakan untuk menghitung selektivitas (α) dan derajat keterpisahan (R_s) adalah sebagai berikut :

$$\alpha = \frac{tR_2 - tR_0}{tR_1 - tR_0}$$

$$R_s = \frac{tR_2 - tR_1}{0,5(W_1 + W_2)}$$

Keterangan :

- tR_0 : waktu tambat komponen 0
- tR_1 : waktu tambat komponrn 1
- tR_2 : waktu tambat komponen 2
- W_1 : lebar dasar puncak komponen 1
- W_2 : lebar dasar puncak komponen 2

Diketahui data perhitungan harga selektivitas dan derajat keterpisahan sebagai berikut :

tR_0	: waktu tambat komponen 0	= 2,593
tR_1	: waktu tambat komponen pada sampel udang	= 3,438
tR_2	: waktu tambat oksitetrasiklin	= 6,651
tR_3	: waktu tambat tetrasiklin	= 7,616
W_1	: lebar dasar puncak komponen pada sampel udang	= 0,7567
W_2	: lebar puncak oksitetrasiklin	= 0,4267
W_3	: lebar puncak tetrasiklin	= 0,3233

Perhitungan selektivitas dan derajat keterpisahan antara oksitetrasiklin dengan komponen dalam udang :

$$\alpha = \frac{tR_2 - tR_0}{tR_1 - tR_0} = \frac{6,651 - 2,593}{3,438 - 2,593} = 1,91$$

$$R_s = \frac{tR_2 - tR_1}{0,5(W_1 + W_2)} = \frac{6,651 - 3,438}{0,5(0,7567 + 0,4267)} = 3,10$$

Perhitungan selektivitas dan derajat keterpisahan antara oksitetrasiklin dengan tetrasiklin :

$$\alpha = \frac{tR_2 - tR_0}{tR_1 - tR_0} = \frac{7,616 - 2,593}{6,651 - 2,593} = 1,16$$

$$R_s = \frac{tR_2 - tR_1}{0,5(W_1 + W_2)} = \frac{7,616 - 6,651}{0,5(0,3233 + 0,4267)} = 1,65$$

Lampiran 2

Perhitungan Batas Deteksi (*LOD*) Dan Batas Kuantitasi (*LOQ*)

Rumus yang digunakan untuk menghitung batas deteksi (*LOD*) dan batas kuantitasi (*LOQ*) adalah sebagai berikut :

$$LOD = 3 \frac{Sb}{s}$$

$$LOQ = 10 \frac{Sb}{s}$$

$$Sb = \frac{Np - p}{5}$$

Keterangan :

Np : tinggi puncak pengotor tertinggi

p : tinggi puncak pengotor terendah

s : slope persamaan garis regresi

Diketahui data perhitungan *LOD* dan *LOQ* sebagai berikut :

Np : 10,22833

p : 6,19744

s oksitetrasiklin : 12,304

s tetrasiklin : 18,8391

$$Sb = \frac{Np - p}{5} = \frac{10,22833 - 6,19744}{5} = 0,80618$$

Perhitungan *LOD* dan *LOQ* untuk oksitetrasiklin adalah sebagai berikut :

$$LOD = 3 \frac{Sb}{s} = 3 \frac{0,80618}{12,304} = 0,19 \mu\text{g/mL}$$

$$LOD = 10 \frac{Sb}{s} = 10 \frac{0,80618}{12,304} = 0,65 \mu\text{g/mL}$$

Perhitungan *LOD* dan *LOQ* untuk tetrasiklin adalah sebagai berikut :

$$LOQ = 3 \frac{Sb}{s} = 3 \frac{0,80618}{18,8391} = 0,13 \mu\text{g/mL}$$

$$LOQ = 10 \frac{Sb}{s} = 10 \frac{0,80618}{18,8391} = 0,43 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 3

Perhitungan Presisi

Rumus yang digunakan untuk menghitung presisi adalah sebagai berikut :

$$SD = \frac{\sum (\bar{X} - x)^2}{n-1}$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan

SD : standar deviasi

\bar{X} : rerata

x : nilai data

n : banyaknya data

KV : koefisien variasi

Untuk oksitetrasiklin diperoleh data sebagai berikut :

Area(mAU*S)
77.81527
78.64854
78.73475
77.29390
77.01609
77.87105
78.93817
76.43529
78.68240
76.23480

$$SD = \frac{\sum (\bar{X} - x)^2}{n-1} = \frac{8,8452}{9} = 0,98280$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% = \frac{0,98208}{77,767026} \times 100\% = 1,26\%$$

Untuk tetrasiklin diperoleh data sebagai berikut :

Area(mAU*S)
57.71626
59.58220
57.47132
58.90631
58.66113
57.63353
57.75154
59.45760
61.27688
62.09816

$$SD = \frac{\sum (\bar{X} - x)^2}{n-1} = \frac{22,83444}{9} = 2,54716$$

$$KV = \frac{SD}{X} \times 100\% = \frac{2,54716}{59,055493} \times 100\% = 4,30\%$$

Lampiran 4

Perhitungan Akurasi (Persen Perolehan Kembali)

Rumus yang digunakan untuk menentukan persen perolehan kembali adalah :

$$\frac{\text{Konsentrasi oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang terdeteksi}}{\text{Konsentrasi oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang ditambahkan}} \times 100\%$$

Oksitetrasiklin dan tetrasiklin yang ditambahkan pada 20,113 g udang adalah 1028 µg/mL dan 1029 µg/mL sebanyak 0,1 mL sehingga berat oksitetrasiklin yang ditambahkan (= 0,1028 mg) dan tetrasiklin (= 0,1029mg)

Hasil kromatogram diperoleh :

A oksitetrasiklin sampel (y) = 157,74860

A tetrasiklin sample (y) = 60,52843

A oksitetrasiklin sampel (y) dimasukkan dalam persamaan kurva baku

$$y = 28,194x - 10,590$$

$$x = 4,6705 \text{ µg/mL}$$

$$x = 46,705 \text{ µg/10mL}$$

$$\text{Persen perolehan kembali oksitetrasiklin} = \frac{46,705}{102,8} \times 100\% = 46,71\%$$

A tetrasiklin sample (y) dimasukkan dalam persamaan kurva baku

$$y = 30,596x + 2,172$$

$$x = 6,9861 \text{ µg/mL}$$

$$x = 69,861 \text{ µg/10mL}$$

$$\text{Persen perolehan kembali tetrasiklin} = \frac{69,861}{102,9} \times 100\% = 69,86\%$$

Lampiran 5

Data Penentuan Akurasi Dan Presisi Metode

Berikut ini data akurasi dan presisi metode dengan pemisahan secara KLT-

Preparatif :

1. Oksitetrasiklin

Replikasi	Berat udang (g)	Area (mAU*s)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Perolehan kembali
1.	20.180	130.45622	3.6844	0.36
2.	20.016	131.63699	3.7270	0.37
3.	19.510	134.67546	3.8368	0.38
4.	18.906	135.56953	3.8691	0.39
Rerata	19.653	133.08455	3.7793	0.38
SD	0.37	5.90	$7.7 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
KV (%)	1.89	4.44	0.20	0.05

2. Tetrasiklin

Replikasi	Berat udang (g)	Area (mAU*s)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Perolehan kembali
1.	20.180	130.69196	9.1209	0.91
2.	20.016	130.98721	9.1298	0.91
3.	19.510	132.87457	9.1873	0.92
4.	18.906	135.65909	9.2720	0.93
Rerata	19.653	132.55341	9.1775	0.92
SD	0.37	5.22	$4.8 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
KV (%)	1.89	3.94	0.05	0.01

Berikut ini adalah data akurasi dan presisi metode dengan pemisahan secara *SPE* :

1. Oksitetrasiklin

Replikasi	Berat udang (g)	Area (mAU*s)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Perolehan kembali
1.	20.113	157.74860	4.6705	46.71
2.	20.134	159.32526	4.7275	47.28
3.	20.110	155.60411	4.5931	45.93
4.	20.096	153.20909	4.5065	45.07
Rerata	20.113	156.47174	4.6244	46.25
SD	$2.46 \cdot 10^{-4}$	7.06	$9.21 \cdot 10^{-3}$	0.92
KV (%)	$1.22 \cdot 10^{-3}$	4.51	0.20	1.99

2. Tetrasiklin

Replikasi	Berat udang (g)	Area (mAU*s)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Perolehan kembali
1.	20.113	60.52843	6.9861	69.86
2.	20.134	62.09058	7.0336	70.34
3.	20.110	61.07826	7.0028	70.03
4.	20.096	59.20662	6.9458	69.46
Rerata	20.113	60.71597	6.9921	69.92
SD	$2.46 \cdot 10^{-4}$	1.45	$1.33 \cdot 10^{-3}$	0.13
KV (%)	$1.22 \cdot 10^{-3}$	2.38	0.02	1.92

Lampiran 6

Data Hasil Penghitungan SPSS

1. Hasil analisa uji t oksitetrasiklin

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 KLT - SPE	45.8725000	.9713350	.4856675	47.4181107	44.3268893	94.452	3	.000

2. Hasil analisa uji t tetrasiklin

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 KLT - SPE	69.0050000	.3742993	.1871497	69.6005938	68.4094062	368.716	3	.000

Lampiran 7

COA Oksitetrasiklin



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name	Oxytetracycline hydrochloride
Product Number	O5875
Product Brand	SIGMA
CAS Number	2058-46-0
Molecular Formula	$C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$
Molecular Weight	496.89

TEST	SPECIFICATION	LOT 071K1584 RESULTS
APPEARANCE	YELLOW POWDER	CONFORMS
SOLUBILITY	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY YELLOW TO YELLOW ORANGE SOLUTION AT 200 MG PLUS 4.0 ML OF WATER:ETHANOL (2:1)	VERY SLIGHTLY HAZY YELLOW ORANGE
MOISTURE CONTENT	NMI 2%	2%
ELEMENTAL ANALYSIS *	50.5 TO 54.5% CARBON	50.7%
	5.3 TO 5.9% NITROGEN	5.3%
PURITY BY HPLC	MINIMUM 95%	97%
NOTE	* ANHYDROUS BASIS	
QC ACCEPTANCE DATE		AUGUST 2001

Lon Schultz, Manager
Analytical Services

Lampiran 8

COA Tetrasiklin




SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name	Tetracycline hydrochloride
Product Number	T3383
Product Brand	SIGMA
CAS Number	64-75-5
Molecular Formula	$C_{22}H_{24}N_2O_4 \cdot HCl$
Molecular Weight	480.90

TEST	SPECIFICATION	LOT 092K1607 RESULTS
APPEARANCE	YELLOW POWDER	CONFORMS
SOLUBILITY	CLEAR YELLOW TO YELLOW-ORANGE SOLUTION AT 50 MG/ML IN WATER	CLEAR YELLOW
LOSS ON DRYING	NMT 2.0%	0.3% *
ASSAY-HPLC (WT%) PER CURRENT EP	95% MINIMUM (DRY BASIS)	98.1% *
NOTE		* SUPPLIER TEST RESULT
SHELF LIFE SOP 10-30-5497	4 YEARS	MAY 2006
QC ACCEPTANCE DATE		NOVEMBER 2007


 Lori Schuk, Manager
 Analytical Services

Lampiran 9

Gambar Instrumen *HPLC*



HPLC 1100-61311A Agilent