

19

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING



PENGEMBANGAN METODE HPLC  
UNTUK ANALISIS RESIDU DAN STUDI DEGRADASI  
ANTIBIOTIKA GOLONGAN NITRFURAN DAN  
TETRASIKLIN DALAM UDANG

Dr.rer.nat. Mochammad Yuwono, MS.,  
Prof. Dr. Gunawan Indrayanto, Drs. Abdul Rahman, M.Si.

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Desember 2007

11-133



# LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING

kk  
kbc  
LP. 53/10  
Yuw  
P



## PENGEMBANGAN METODE HPLC UNTUK ANALISIS RESIDU DAN STUDI DEGRADASI ANTIBIOTIKA GOLONGAN NITRIFURAN DAN TETRASIKLIN DALAM UDANG

Dr.rer.nat. Mochammad Yuwono, MS.,  
Prof. Dr. Gunawan Indrayanto, Drs. Abdul Rahman, M.Si.

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Desember 2007

LATOHAN PERILAKU HIBAL BERSAMA



PERSEKUTUAN MAMUK DAN MAMUK  
UNTUK ALABIS RESIDU DAN STUDI ORGANISASI  
ANTIBIOTIK GORGAN MENTERI  
TETAPAN DALAM UJANG

Prof. Dr. Guntawan Indrayana, Dir. Akad. Keperawatan  
1217, Jalan Jendral Sudirman, Yogyakarta, 55121

UNIVERSITAS ANGLIA  
Dorchester, Dorset

## HALAMAN PENGESAHAN

JUDUL : Pengembangan Metode HPLC untuk Analisis Residu dan Studi Degradasi Antibiotika Golongan Nitrofuran dan Tetrasiklin dalam Udang

**Ketua Peneliti**

Nama : Dr. rer.nat. Mochammad Yuwono, MS  
Jenis Kelamin : Laki-laki  
Pangkat/Golongan : Penata / (III/c)  
NIP : 131 569 384  
Jabatan Sekarang : Lektor Kepala  
Fakultas/Jurusan : Farmasi/Kimia Farmasi  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Tim Peneliti**

No.	NAMA DAN GELAR AKADEMIK	BIDANG KEAHLIAN	INSTANSI
1.	Dr.rer.nat. Mochammad Yuwono, MS	Kimia Farmasi/ Analisis Obat dan Makanan	Fakultas Farmasi UNAIR
2.	Prof. Dr. Gunawan Indrayanto	Bioteknologi/ Analisis Farmasi	Fakultas Farmasi UNAIR
3.	Drs. Abdul Rahman, M.Si	Biologi Farmasi	Fakultas Farmasi UNAIR

Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian : 2 (dua) tahun  
Biaya diusulkan selama 2 tahun : Rp. 99,310,000,-  
Biaya yang disetujui tahun 2006-2007 : Rp. 69,000,000

Surabaya, 28 Desember 2007  
Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Farmasi

(Prof. Dr. H. Achamad Syahrani, MS)  
NIP. : 130809077

(Dr.rer.nat.Mochammad Yuwono, MS.)  
NIP. : 131 569 384

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

(Prof. Dr. H. Sarmanu, Drh., MS.)  
NIP. 130/701 125

## RINGKASAN

### **Judul Penelitian: Pengembangan Metode HPLC untuk Analisis Residu dan Studi Degradasi Antibiotika Golongan Nitrofurana dan Tetrasiklin dalam Udang**

Mochammad Yuwono, Gunawan Indrayanto, Abdul Rahman, 2007, Fakultas Farmasi Unair, dibiayai Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Depdiknas, No: 318/SP3/PP/DP2M/II/2006

Pada saat ini, penggunaan antibiotika di bidang peternakan sudah demikian luas, yang dimaksudkan untuk tindakan pencegahan dan pengobatan terhadap suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri atau mikroorganisme lain. Penggunaan antibiotika tersebut apabila terus-menerus dan tidak tepat ternyata dapat meninggalkan residu yang dapat mengakibatkan perubahan ekologis pada flora normal konsumen sehingga menjadi resisten. Residu antibiotika dalam udang juga dapat menghambat pengembangan komoditi. Oleh karena itu, untuk menjamin kesehatan konsumen dan meningkatkan kualitas udang, maka perlu dilakukan monitoring residu antibiotika pada udang khususnya udang ekspor, yang dalam hal ini diperlukan suatu metode analisis yang sensitif, akurat, cermat dan spesifik. Persyaratan bahwa maksimum residu antibiotika golongan nitrofurana dan golongan tetrasiklin yang diperbolehkan terkandung di dalam udang adalah 1 ppb.

Tujuan penelitian ini adalah pengembangan dan validasi metode analisis HPLC untuk deteksi residu antibiotika golongan nitrofurana di dalam udang secara simultan baik dalam bentuk senyawa induk maupun senyawa metabolitnya. Selain itu, pengembangan dan validasi metode ditujukan untuk deteksi residu antibiotika golongan tetrasiklin secara simultan di dalam sampel udang.

Sebelum dilakukan analisis dengan HPLC, sampel udang dipreparasi terlebih dahulu yakni melalui ekstraksi cair-cair untuk menghilangkan lemak dan kandungan lain di dalam matriks sampel. Ekstrak yang diperoleh dimurnikan (clean-up) dengan pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Preparatif dan Ekstraksi padat cair

(SPE). Optimasi kondisi HPLC dilakukan untuk mendapatkan puncak-puncak masing-masing analit yang terpisah dengan analit lainnya serta terpisah pula dari komponen lain yang berasal dari matriks sampel udang. Kondisi optimum HPLC untuk pemisahan residu antibiotika golongan nitrofurantoin tercapai dengan menggunakan kolom Lichrospher ODS RP-18, 4 x 250 mm, 5  $\mu$ m; Fase gerak : Acetonitrile : Dapar phosphate pH 7 (elusi gradien), Panjang gelombang : 365 nm, suhu kolom : 30°C dan kecepatan fase gerak: 1 ml/menit. Sedangkan kondisi optimum untuk golongan tetrasiklin tercapai dengan menggunakan kolom: Hypersil BDS C-18 4.6x250mm 5 mikron, fase gerak: Acetonitrile : Dapar phosphate pH 7 (elusi gradien), Panjang gelombang : 350 nm, Suhu kolom : 30°C, Kecepatan fase gerak: 1 ml/menit. Untuk analisis metabolit nitrofurantoin, preparasi sampel dilakukan setelah sampel diderivatisasi terlebih dahulu dengan 2-nitrobenzaldehid.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode bersifat selektif dengan presisi untuk golongan nitrofurantoin berkisar antara 8-12,6 % dan 1,44-5,15% untuk golongan tetrasiklin. Recovery untuk golongan nitrofurantoin adalah 28,88%; 29,78%; 50,97% dan 42,96% berturut-turut untuk nitrofurantoin, nitrofurazone, furazolidone, dan furaltadone. Sedangkan recovery untuk golongan tetrasiklin adalah 76,33%; 72,13%; 31,88% dan 54,96% berturut-turut untuk oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin. Limit deteksi untuk golongan nitrofurantoin adalah 0,0005  $\mu$ g/peak masing-masing berturut-turut untuk nitrofurantoin, nitrofurazone, dan furazolidone, dan 0,0008  $\mu$ g/peak untuk furaltadone. Limit deteksi untuk golongan tetrasiklin adalah 0,0030; 0,0026; 0,0048; 0,0040  $\mu$ g/peak masing-masing berturut-turut untuk oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin. Penelitian terhadap metabolit nitrofurantoin dihasilkan metode yang secara simultan dapat memisahkan secara selektif selektif masing-masing metabolit.

## SUMMARY

Antibiotics are widely used in veterinary medicines for the prophylaxis and the treatment of diseases. All these cases raise the occurrence of antibiotic residues in animal tissue, which can cause serious health problems for humans, leading to an increasing drug resistance of microorganisms. Nitrofurans and tetracyclines are broad spectrum antibiotics, which have been banned for food and fisheries products animals by the European Union, the United States and some other countries. The EU Commission Decision of 13 March 2003 has set minimum required performance limits (MRPLs) at 1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for each nitrofurans derivate or metabolite. For this purpose, HPLC is the most widely used technique for determining antibiotic residues in food sample origin, such as shrimps. With HPLC technique it is possible to reduce interfering background peaks on chromatogram and increase specificity.

The purpose of the present work was to develop a precise and accurate HPLC method for the detection of the antibiotic residues in shrimps, either in the form of parent compounds or metabolites. Prior to the HPLC analysis, the sample preparation for antibiotic residues analysis have been done using a single solvent to extract the analyte(s) from samples followed by liquid-liquid extraction and by evaporation and reconstitution in a suitable solvent or the mobile phase. The clean-up was done using a preparative TLC and Solid Phase Extraction.

The nitrofurans were separately well using Lichrospher ODS RP-18, 4 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  column with the mobile phase of acetonitrile : phosphate pH 7 (gradient elution) detected at 365 nm. The temperature of column was set at 30°C and flow rate at 1 ml/min. The separation of tetracyclines was achieved by using Hypersil BDS C-18 4.6x250mm 5 mikron, mobile phase of acetonitrile : phosphate buffer (pH 7). The analytical wavelength and the temperature of the column were set at 350 nm and 30°C, respectively..

The method was selective with the resulted precision ranged from 8 to 12.6 % for nitrofurans and from 1.44-5.15% for tetracyclines. The method was also selective for the



Separation of metabolites after derivatizing with 2-nitrobenzaldehyde. The recoveries of nitrofurans were 28.88%; 29.78%; 50.97% and 42.96% for nitrofurantoin, nitrofurazone, furazolidone, and furaltadone, respectively; Whereas the recoveries for tetracyclines were 76.33%; 72.13%; 31.88% and 54.96%, respectively for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline. The detection limit of the method was 0.0005 µg/peak for nitrofurantoin, nitrofurazone, and furazolidone, whilst 0.0008 µg/peak for furaltadone. The detection limit for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline was 0.0030; 0.0026; 0.0048 and 0.0040 µg/peak, respectively. The proposed method was successfully used for the separation of the metabolites of nitrofurans and tetracyclines.

## **PRAKATA**

Segala puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan karunia Nya sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian kami yang berjudul : **“Pengembangan Metode HPLC untuk Analisis Residu dan Studi Degradasi Antibiotika Golongan Nitrofuram dan Tetrasiklin dalam Udang”**

Dalam kesempatan ini kami sampaikan terima kasih kepada pemerintah dalam hal ini Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Ditjen Dikti Depdiknas Republik Indonesia yang telah berkenan memberikan biaya sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

Terima kasih kami sampaikan pula kepada Rektor, Ketua Lembaga Penelitian dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan dan menggunakan berbagai fasilitas yang diperlukan untuk melakukan penelitian.

Terima kasih juga kami sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran dan penyelesaian penelitian kami.

Semoga Allah melimpahkan rahmat dan karunia Nya kepada semua pihak, sebagai balasan atas bantuan dan kebaikan yang diberikan kepada kami.

**Tim Peneliti**

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	iii
PRAKATA .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
I. PENDAHULUAN .....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	5
IV. METODE PENELITIAN .....	11
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	16
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	33
DAFTAR PUSTAKA .....	35



## DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1. Data hasil analisis HPLC campuran standar golongan Nitrofuram .....	19
Tabel 5.2. Harga Match Factor (MF) dan purity factor .....	22
Tabel 5.3. Data presisi dan akurasi metode .....	22
Tabel 5.4. Data Batas Deteksi .....	23
Tabel 5.5. Data selektivitas HPLC untuk golongan Tetrasiklin yang ditambahkan ke dalam matriks sample .....	26
Tabel 5.6. Harga Match Factor (MF) dan purity factor .....	29
Tabel 5.7. Data presisi dan akurasi metode (n = 6) .....	29
Tabel 5.8. Data Batas Deteksi .....	30

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur molekul Antibiotika golongan Nitrofurantoin beserta Metabolitnya .....	5
Gambar 2. Struktur molekul golongan tetrasiklin .....	6
Gambar 3. Struktur molekul Tetrasiklin dan hasil degradasinya .....	7
Gambar 5.1. Pemisahan antibiotika golongan nitrofurantoin secara HPLC .....	16
Gambar 5.2. Spektra UV dari standar Nitrofurantoin (1); Nitrofurazon (2); Furazolidon (3) dan Furaltadon (4) .....	17
Gambar 5.3 menunjukkan kromatogram larutan ekstrak blanko sampel .....	18
Gambar 5.4. Overlay spectra standar Furazolidon dan spectra furazolidon yang ditambahkan ke dalam blanko sample .....	20
Gambar 5.5. Overlay spectra standar furaltadone dan spektra furaltadone yang ditambahkan ke dalam blanko sampel.....	20
Gambar 5.6. Overlay spectra standar Nitrofurazon dan spektra nitrofurazon yang ditambahkan ke dalam blanko sample .....	21
Gambar 5.7. Overlay spektra standar nitrofurantoin dan spektra nitrofurantoin yang ditambahkan ke dalam blanko sample .....	21
Gambar 5.8. Pemisahan antibiotika golongan tetrasiklin secara HPLC. ....	24
Gambar 5.9 menunjukkan kromatogram larutan ekstrak blanko sampel .....	25
Gambar 5.10 kromatogram standar yang ditambahkan ke dalam matrik sampel.....	25
Gambar 5.11. Overlay spectra standar Oksitetrasiklin dan spectra Oksitetrasiklin yang ditambahkan ke dalam blanko sampel .....	27
Gambar 5.12. Overlay spectra standar tetrasiklin dan spektra tetrasiklin yang ditambahkan ke dalam blanko sampel .....	27
Gambar 5.13. Overlay spectra standar Nitrofurazon dan spektra nitrofurazon yang ditambahkan ke dalam blanko sampel.....	28
Gambar 5.14. Overlay spektra standar doksisisiklin dan spektra doksisisiklin yang ditambahkan ke dalam blanko sampel .....	28

Gambar 5.15 Pemisahan metabolit nitrofuram .....	31
Gambar 5.16 Pemisahan golongan tetrasiklin setelah sampel disimpan 1 hari .....	32
Gambar 5.17 Pemisahan golongan tetrasiklin setelah sampel disimpan 3 hari .....	32

## BAB I

### PENDAHULUAN

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 atau mikroorganisme lain. Penggunaan antibiotika tersebut apabila terus-menerus dan tidak tepat ternyata dapat meninggalkan residu. Apabila kandungan residu antibiotika tersebut dalam udang melebihi daripada batas yang diijinkan, maka hal itu dapat mengakibatkan perubahan ekologis pada flora normal konsumen sehingga menjadi resisten<sup>[1-3]</sup>.

Residu antibiotika dalam udang dapat menghambat pengembangan komoditi ekspor, karena negara-negara pengimpor udang akhir-akhir ini telah memberikan persyaratan yang semakin ketat terhadap kandungan residu antibiotika tersebut. Negara-negara tersebut tidak mau menerima apabila dalam udang ekspor terbukti mengandung residu antibiotika dalam batas-batas tertentu. Oleh karena itu, untuk menjamin kesehatan konsumen dan meningkatkan kualitas udang, maka perlu dilakukan monitoring residu antibiotika pada udang khususnya udang ekspor, yang dalam hal ini diperlukan suatu metode analisis yang sensitif, akurat, cermat dan spesifik.

Dua golongan antibiotika yang saat ini banyak digunakan di bidang peternakan udang adalah golongan Nitrofurantoin dan Tetrasiklin. Dua golongan antibiotika ini memiliki spektrum aktivitas antibiotik yang luas, terutama terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Antibiotika golongan nitrofurantoin yang sering digunakan adalah furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin dan nitrofurazone. Salah satu sifat antibiotika ini adalah sangat cepat dimetabolisme oleh hewan dengan waktu paruh *in vivo* hanya beberapa jam dan selanjutnya menghasilkan metabolit-metabolit yang stabil selama beberapa minggu yang berada sebagai residu yang terikat pada protein jaringan. Metabolit dari furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin dan nitrofurazone berturut-turut adalah 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AH) dan semicarbazide (SC)<sup>[2,4]</sup>. Beberapa penelitian melaporkan bahwa nitrofurantoin memiliki efek mutagenik yang diamati pada fungi, bakteri

dan submamalia. Disamping itu, furazolidone dan AOZ sebagai metabolit utamanya dilaporkan bersifat genotoksik dan karsinogenik. Oleh karena itu, nitrofurantoin telah dilarang di Amerika Serikat, Eropa dan beberapa negara lain untuk digunakan di bidang peternakan. Batas residu maksimum yang diperbolehkan pada udang adalah 1 ppb<sup>[5]</sup>.

Antibiotika golongan tetrasiklin meliputi oksitetrasiklin, tetrasiklin, klorotetrasiklin dan doksisisiklin. Tetrasiklin merupakan metabolit utama dari oksitetrasiklin. Oksitetrasiklin bersifat tidak stabil dan mudah membentuk hasil degradasi seperti 4-epi-oxytetracycline (EOTC), tetracycline (TC) and 2-acetyl-2-decarboxamido-oxytetracycline (ADOTC). Menurut Farmakope Eropa, dalam bahan baku oksitetrasiklin juga ditemukan degradan anhydro-oxytetracycline (AOTC),  $\alpha$ -apo-oxytetracycline ( $\alpha$ -AOTC),  $\beta$ -apo-oxytetracycline ( $\beta$ -AOTC)<sup>[3]</sup>.

Analisis residu antibiotika di dalam udang dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain metode mikrobiologis<sup>[6]</sup> dan HPLC (High Performance Liquid Chromatography) atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pada saat ini, metode HPLC merupakan metode yang paling banyak digunakan dan merupakan metode resmi untuk pemeriksaan residu antibiotika dalam berbagai sampel seperti udang, madu, daging, ikan, telur dan makanan ternak<sup>[7-12]</sup>. HPLC memiliki keunggulan pada limit deteksi yang kecil serta penggunaan detektor yang selektif dan spesifik.

Permasalahan analisis residu antibiotika terletak pada kompleksnya sampel, dan sangat kecilnya kadar residu dalam sampel. Antibiotika golongan tetrasiklin umumnya sangat sulit diekstraksi karena zat ini terikat kuat dengan protein sampel, berikatan dengan ion-ion logam dan sisa silanol dalam kolom fase terbalik HPLC. Hal ini berakibat bahwa pada kromatogram seringkali dihasilkan puncak-puncak yang berekor dan umumnya dihasilkan akurasi yang rendah. Selain itu, tetrasiklin relatif tidak stabil dan mudah mengalami epimerisasi<sup>[13-15]</sup>. Degradasi antibiotika golongan tetrasiklin ini semakin menambah sulitnya analisis antibiotika tersebut. Penelitian-penelitian sebelumnya melaporkan penggunaan ekstraksi cair-cair yang diikuti dengan pemurnian (clean-up) dengan ekstraksi padat-cair (SPE) melalui prosedur yang sangat rumit<sup>[16-20]</sup>. Oleh karena itu, kondisi HPLC dan preparasi sampel yang sederhana perlu dioptimasi, dikembangkan dan divalidasi untuk mendapatkan hasil analisis yang sensitif dan akurat pada analisis residu secara simultan. Sementara itu, permasalahan analisis residu



antibiotika golongan nitrofurantoin khususnya terletak pada metabolit-metabolit yang berada pada konsentrasi yang sangat rendah. Dengan berdasar pada efek toksik dari metabolit antibiotika khususnya golongan nitrofurantoin, negara pengimpor udang akhir-akhir ini lebih memperketat persyaratan kandungan residu dalam udang bukan hanya didasarkan pada residu dalam bentuk senyawa induk tetapi akhir-akhir ini juga pada zat metabolitnya. Dalam hal ini, metode yang banyak digunakan akhir-akhir ini adalah LC-MS/MS [21-24].

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas, pengembangan dan validasi metode HPLC untuk mendapatkan kondisi optimum serta presisi dan akurasi yang tinggi memiliki peran penting untuk memecahkan permasalahan analisis residu antibiotika dalam udang. Pada penelitian ini akan dilakukan pengembangan dan validasi metode HPLC untuk analisis residu antibiotika secara simultan dalam sampel udang menggunakan detektor *Photo Diode Array* (PDA). Penggunaan detektor ini diharapkan dapat mengidentifikasi analit secara lebih selektif dan spesifik yang dalam hal ini bukan hanya atas dasar kesamaan waktu retensi antara analit dan zat pembanding saja tetapi juga atas dasar angka kemiripan dan kemurnian puncak pada kromatogram yang dihasilkan. Pada tahap I dalam penelitian ini dilakukan optimasi kondisi pemisahan, pengembangan preparasi sampel yang sederhana dan validasi metode analisis secara simultan terhadap campuran senyawa induk golongan nitrofurantoin (*furazolidon*, *furaladon*, *nitrofurantoin*, *nitrofurazon*) dan golongan tetrasiklin (*oksitetrasiklin*, *tetrasiklin*, *klortetrasiklin* dan *doksisiklin*). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah udang harimau (*Black tiger*, *Panaeus monodon*) yang melibatkan preparasi sampel dalam bentuk ekstraksi cair-cair dilanjutkan dengan pemurnian sampel dengan Kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif atau ekstraksi padat-cair (SPE) sebelum dilakukan analisis dengan HPLC. Pada tahap II akan dilanjutkan optimasi kondisi, pengembangan preparasi sampel serta validasi metode yang ditujukan untuk pemisahan dan analisis residu metabolit golongan nitrofurantoin yakni AOZ (3-amino-2-oxazolidinone), AMOZ (3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone), AH (1-aminohydantoin) dan SC (semicarbazide). Cara yang sama dilakukan pula untuk golongan Tetrasiklin, hanya saja metabolit antibiotika golongan tetrasiklin diperoleh dengan cara didegradasi terlebih dahulu dengan cara pemanasan.

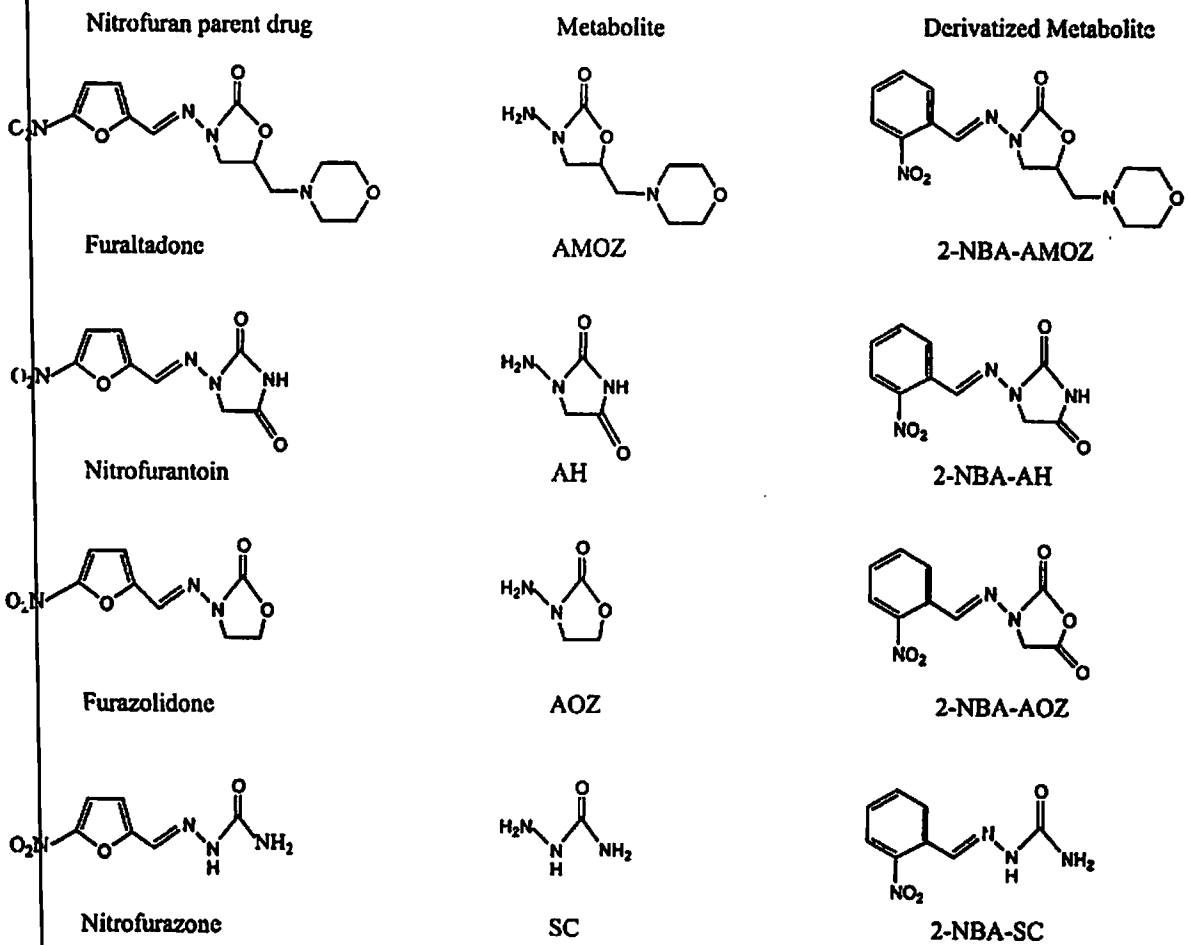
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan tentang antibiotika golongan Nitrofuran

Nitrofuran adalah golongan antibiotika yang sering digunakan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit pada udang harimau (*Black Tiger, Panaeus monodon*) dan udang vanamei yang disebabkan oleh bakteri dan mikroorganisme lain. Selain itu, nitrofuran juga digunakan sebagai antibiotika pada unggas. Termasuk antibiotika golongan nitrofuran adalah furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin dan nitrofurazone. Pada hewan, antibiotika ini mengalami metabolisme sangat cepat dengan waktu paruh *in vivo* hanya beberapa jam. Metabolit dari furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin dan nitrofurazone berturut-turut adalah 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AH) dan semicarbazide (SC). Struktur molekul golongan nitrofuran dan metabolitnya dapat dilihat pada gambar 1.

Nitrofuran memiliki efek karsinogenik dan mutagenik pada manusia jika dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama. Efek ini diduga disebabkan oleh senyawa metabolitnya antara lain 3-amino-2-oksazolidinon (AOZ).



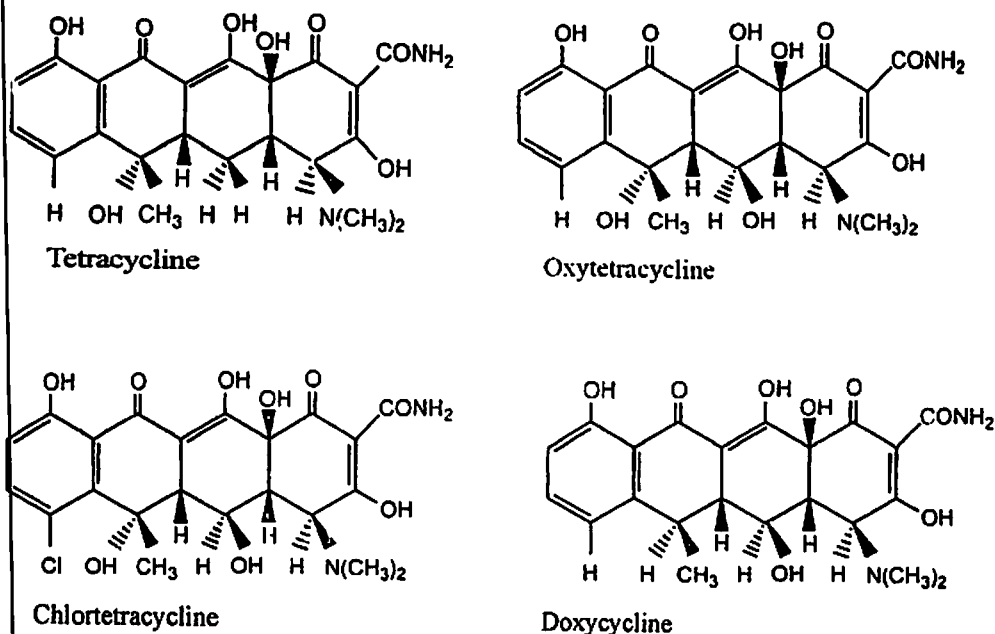
Gambar 1. Struktur molekul Antibiotika golongan Nitrofurans beserta metabolit-metabolitnya

## 2.2. Tinjauan tentang antibiotika golongan Tetrasiklin

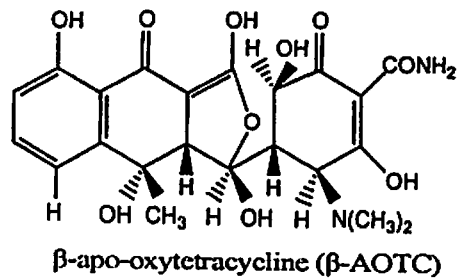
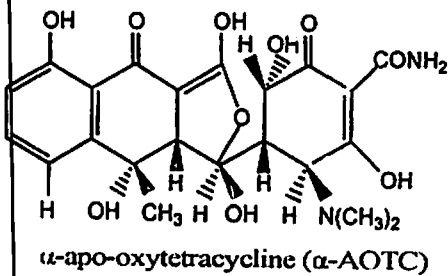
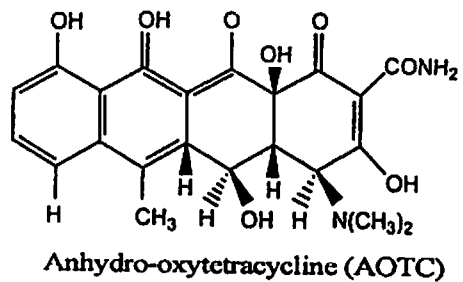
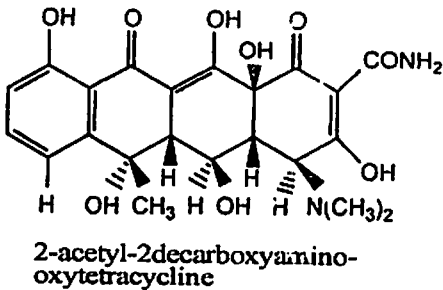
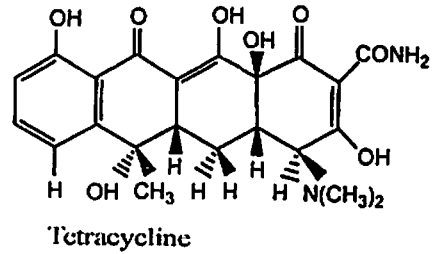
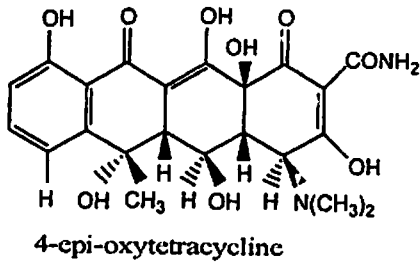
Antibiotika golongan tetrasiklin meliputi oksitetrasiklin, tetrasiklin dan klor tetrasiklin. Tetrasiklin merupakan metabolit utama dari oksitetrasiklin. Oksitetrasiklin dan tetrasiklin merupakan serbuk hablur berwarna kuning, tidak berbau, berasa pahit dan higroskopis. Warna berubah menjadi gelap oleh pengaruh cahaya, bersifat amfoter sehingga dapat membentuk garam dengan asam dan basa. Dengan kalsium, magnesium, barium dan besi, membentuk khelat. Dalam larutan pH < 2, potensi turun dan cepat tergradasi oleh pengaruh alkali hidroksida. Degradasi oksitetrasiklin menghasilkan zat-

zat seperti 4-epi-oxytetracycline (EOTC), tetracycline (TC) and 2-acetyl-2-decarboxamido-oxytetracycline (ADOTC) [2,4]. Menurut Farmakope Eropa, Oksitetrasiklin juga mengandung anhydro-oxytetracycline (AOTC),  $\alpha$ -apo-oxytetracycline ( $\alpha$ -AOTC),  $\beta$ -apo-oxytetracycline ( $\beta$ -AOTC).

Golongan tetrasiklin sangat sukar larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, mudah larut dalam HCl 3N dan larutan alkali (Martindale, 1982). Termasuk golongan antibiotika berspektrum luas, efektif terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Spektrum anti bakterinya hampir sama dengan spektrum Penisilin, Streptomisin dan Kloramfenikol.



Gambar 2. Struktur molekul golongan tetrasiklin



Gambar 3. Struktur molekul Tetrasiklin dan hasil degradasinya

### 2.3. Tinjauan tentang Analisis Residu Antibiotika secara HPLC

Untuk tujuan analisis residu antibiotika, HPLC merupakan metode yang paling banyak digunakan dan merupakan metode yang dipersyaratkan oleh negara-negara pengimpor udang seperti Eropa, USA dan Jepang.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) termasuk kromatografi cair yang dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif atau untuk tujuan

preparatif. Mekanisme pemisahan pada HPLC dapat berupa proses adsorpsi, partisi, pertukaran ion atau permeasi gel. Untuk analisis kualitatif dan kuantitatif, sampel mula-mula dimurnikan terlebih dahulu dengan cara ekstraksi cair-cair atau ekstraksi padat-cair, lalu disaring kemudian diinjeksikan pada gerbang suntik. Larutan sampel setelah itu mengalami pemisahan di dalam kolom sehingga antara analit satu dengan yang lain keluar dari kolom dalam waktu yang berbeda-beda dimana masing-masing analit tersebut terdeteksi oleh detektor yang digunakan. Kolom HPLC merupakan bagian terpenting karena sangat menentukan berhasil dan tidaknya suatu pemisahan antara analit satu dengan lainnya atau antara analit dengan komponen-komponen lain di dalam sampel. Dalam hal ini, kolom HPLC yang digunakan umumnya berupa kolom fase terbalik (*Reversed Phase, RP*) yang mengandung fase diam bersifat non polar, dan fase gerak yang digunakan bersifat polar. Detektor "Photo Diode-Array" adalah detektor UV-Vis dengan keistimewaan antara lain memiliki kecepatan deteksi sekitar 300-400 kali detektor *PMT* dan memiliki fasilitas yang lebih selektif atau lebih spesifik pada identifikasi analit. Melalui penumpukan (*overlay*) spektra UV-Vis analit dalam sampel dengan spektra zat standar maka dapat diketahui seberapa jauh kemiripan keduanya. Tolak ukur kemiripan tersebut dapat dinyatakan dalam MF (*Match Factor*) atau harga koefisien korelasi  $r$  dengan nilai  $MF > 990$  atau  $r > 0,99$ . Angka kemiripan ini memiliki peran penting khususnya untuk analisis senyawa-senyawa dalam sampel biologis. Jika hanya dipakai detektor UV-Vis saja, analit umumnya hanya dikenali melalui waktu retensi saja. Dalam hal ini, waktu retensi antara analit dengan standar yang sama, bukanlah jaminan bahwa analit di dalam sampel tersebut benar-benar identik. Tetapi pada penggunaan detektor PDA, identifikasi tersebut lebih selektif karena melalui penumpukan spektra tersebut di atas dapat diketahui apakah analit di dalam sampel sama dengan standar. Seringkali ditemui bahwa analit dalam sampel dapat berupa metabolit atau degradan yang memiliki waktu retensi sama tetapi spektra UV-Vis yang berbeda. Selain itu, penggunaan detektor PDA melalui parameter *purity factor* dapat diketahui bahwa puncak (*peak*) pada kromatogram bersifat murni atau terkontaminasi dengan zat-zat lain. Penggunaan detektor PDA berperan lebih penting untuk mendapatkan validitas metode khususnya dalam hal selektivitas atau spesifisitas metode disamping parameter validasi metode lainnya seperti akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi.

Selektivitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan antara zat yang dianalisa dengan zat lain. Selain penggunaan MF dan harga  $r$  tersebut di atas, pada metode *HPLC* harus menghasilkan puncak-puncak pada kromatogram yang terpisah antara satu dengan lainnya yang dibuktikan dengan harga resolusi lebih besar dari 1,5. Review analisis residu menggunakan *HPLC* dipublikasikan oleh Oka <sup>[14]</sup>.

## BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### TUJUAN PENELITIAN

Tujuan yang hendak dicapai dengan penelitian ini adalah :

1. Mengembangkan ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat cair (SPE) untuk ekstraksi antibiotika golongan nitrofuram dan tetrasiklin dalam udang agar diperoleh persen recovery yang tinggi.
2. Memperoleh kondisi optimum HPLC pada pemisahan antibiotika secara simultan senyawa induk untuk golongan nitrofuram furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin, nitrofurazon) dan golongan tetrasiklin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin).
3. Memperoleh kondisi optimum HPLC pada pemisahan antibiotika secara simultan senyawa anabolit untuk golongan nitrofuram yakni 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AH) dan semicarbazide (SC) dan golongan tetrasiklin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin).
4. Mendapatkan metode analisis yang valid dengan batas deteksi sama dengan atau lebih kecil daripada konsentrasi residu yang diperbolehkan oleh negara pengimpor udang.
5. Mengetahui selektivitas metode pada sampel yang tergradasi

### MANFAAT PENELITIAN

Manfaat penelitian adalah dihasilkannya metode analisis yang sensitif dan selektif sehingga dapat digunakan *pertama*, untuk analisis secara simultan terhadap campuran residu antibiotika golongan nitrofuram dalam udang baik dalam bentuk senyawa induk maupun metabolit dan *kedua*, untuk analisis residu oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin secara simultan dalam sampel udang. Metode analisis yang dihasilkan ini diharapkan dapat digunakan untuk pemeriksaan rutin residu antibiotika golongan nitrofuram dan tetrasiklin baik atas dasar senyawa induknya maupun terhadap metabolitnya.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Sampel

Sampel yang digunakan adalah udang harimau (Black tiger, *Panaeus monodon*) yang diperoleh dari para eksportir udang.

#### 4.2. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan sebagai standar/zat pembanding: oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin (Sigma-Aldrich); furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin dan nitrofurazone (Sigma-Aldrich); Pelarut sebagai fase gerak HPLC: metanol p.HPLC (J.T.Baker); asetonitril p.HPLC (Merck), Aqua Bidestilata Pro Injection (PT. Ikapharmindo Putramas); Pelarut/bahan untuk ekstraksi: n-Heksana p.a (Merck), metanol p.a (Merck), aceton p.a (Riedel de Haen), acetonitrile p.a (Merck), Chloroform p.a (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> p.a (Merck), Asam sitrat p.a (Merck), Na-EDTA (Merck), Asam oksalat p.a (Merck).

#### 4.3. Alat

Instrumen HPLC 1100-61311A Agilent with diode-array detector, kolom Hypersil ODS 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, dan Hypersil BDS 250 mm x 4,6 mm, 5 µm detektor Diode-Array, Ultrasonikator (Julabo), Sentrifus (Hettich), Neraca Analitik (Mettler Toledo AB104), vortex mixer (Barnstead Thermolyn), Nylon Membrane Filter 0,2 µm (Whatmann), Rotavapor dan pH meter (Windaus), TLC-Chamber, TLC plates Silica gel 60 F254 (Merck).

#### 4.4. Metode Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan larutan baku dan larutan pereaksi
2. Preparasi sampel yang melibatkan ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair
3. Optimasi kondisi HPLC
4. Uji selektivitas metode

5. Uji akurasi dan presisi metode
6. Penentuan batas deteksi metode

#### **4.4.1. Pembuatan Larutan baku Campuran**

Ditimbang teliti masing-masing standar golongan tetrasiklin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin) 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 dan 0,1 ppm.

Prosedur yang sama dilakukan pula untuk antibiotika golongan nitrofuran (furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin, nitrofurazon) dan metabolit nitrofuran (AOZ, AMOZ, SC dan AH).

#### **4.4.1.2. Pembuatan larutan 0,1 M EDTA-McIllvaine-Buffer pH 4,0**

Larutan 100 mM asam sitrat sebanyak 70,6 mL dimasukkan ke dalam beaker glass, ditambah dengan 131,7 mL larutan 500 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , kemudian pH larutan diatur sampai pH 4,0 dengan penambahan air sampai 400 mL. Ke dalam larutan ini dilarutkan 14,889 g Na-EDTA. Larutan ini digunakan untuk ekstraksi golongan tetrasiklin dari sampel udang.

#### **4.4.1.3. Penentuan Susut Pengeringan Udang**

Ditimbang 100,0 g udang basah (3x) dikeringkan dalam oven dengan suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 24 jam, udang kering ditimbang dan dihitung rata-rata berat kering.

#### **4.4.1.4. Ekstraksi dan pemurnian (clean-up) metabolit nitrofuran**

Standar keempat analit golongan Nitrofuran (Nitrofurantoin, Nitrofurazon, Furazolidon dan Furaltadon) dengan konsentrasi tertentu ditambahkan ke dalam 50,0 gram serbuk sampel kering, kemudian dihilangkan lemaknya dengan penambahan 100 ml n-Hexan, diultrasonik selama 15 menit dan dikocok dengan shaker selama 5 menit. Sampel kemudian diekstraksi dengan 100 ml aseton, fase aseton dikumpulkan dan diuapkan dengan bantuan rotavapor pada suhu 30-45 menit sampai kering. Residu yang diperoleh

dilarutkan dalam 10 ml asetonitril, diuapkan di dalam lemari asam sampai volume sekitar 1 ml. Clean up dilakukan dengan cara KLT preparatif.

#### 4.4.1.5 Ekstraksi dan pemurnian (clean-up) metabolit nitrofuran

Sampel udang dikeringkan dalam oven suhu 50 °C sampai kering, diserbukkan, ditimbang, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, ditambah dengan larutan standar campuran metabolit nitrofuran (AOZ, AMOZ, SC dan AH). Tahap selanjutnya derivatisasi dengan 2-nitrobenzaldehida. Selanjutnya adalah tahap penghilangan lemak (*defatting*). Dalam hal ini, ke dalam labu Erlenmeyer tersebut ditambahkan larutan heksana, dikocok, lalu diultrasonik selama 15 menit, dikocok dengan shaker selama 5 menit, didekantasi dan disaring. Proses diulangi sampai 4 kali. Hasil yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan aseton. Ekstrak aseton yang terkumpul dipekatkan dengan rotary evaporator (suhu 50 °C, 90 rpm). Setelah itu dilakukan pemurnian (clean-up) dengan ekstraksi padat-cair (Solid-Phase Extraction, SPE), atau menggunakan Kromatografi lapis tipis preparatif. Hasil yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan asetonitril, disaring dengan filter 0.2 µm, dan diinjeksikan ke dalam HPLC.

#### 4.4.1.6. Ekstraksi dan pemurnian (clean-up) Golongan Tetrasiiklin

Standar keempat analit golongan tetrasiklin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin) dengan konsentrasi masing-masing 100 µg ditambahkan ke dalam 2,0 gram serbuk blanko sampel kering. Sampel kemudian diekstraksi dengan 10,0 mL 0.1 M *EDTA-McIllvaine buffer* dengan tahapan divorteks selama 1 menit, dilanjutkan dengan ultrasonikasi selama 15 menit, didiamkan lalu didekantir, larutan ditampung dalam labu ukur 25 ml. Ekstraksi diulangi sampai 3 kali. Ekstrak yang terkumpul ditambah dengan mL larutan 0.1 M *EDTA-McIllvaine buffer* sampai garis tanda, dan dikocok sampai homogen. Dari larutan kemudian dipipet 3,0 ml dan dimurnikan (clean up) dengan ekstraksi padat cair (*SPE*) yang telah dikondisikan dengan metanol dan kemudian dengan larutan *McIllvaine buffer*. *SPE* kemudian dibilas dengan 2 ml metanol, filtrat ditampung dalam labu ukur 10,0 ml dan ditambah metanol sampai garis tanda. Larutan disaring dengan membran nylon 0,2 µm sebelum diinjeksikan pada *HPLC*. Eluat yang belum



diclean up juga dianalisis untuk mengetahui profil sebelum dan sesudah clean up.

#### 4.4.1.7. Optimasi Kondisi HPLC

Ke dalam sistem HPLC diinjeksikan larutan baku campuran, diamati bentuk peak dan resolusi antara peak satu dengan lainnya. Beberapa variabel kondisi HPLC yang dicoba meliputi pemakaian beberapa macam fase gerak, jenis kolom, suhu kolom, kecepatan fase gerak, dan panjang gelombang analitik. Kondisi optimum tercapai jika peak-peak yang dihasilkan memenuhi syarat dalam hal angka simetri (tailing factor)  $< 2$  dan Resolusi ( $R_s$ )  $> 1,5$ .

#### 4.4.1.8. Uji Selektivitas Metode

Campuran standar keempat analit golongan Nitrofurantoin, Nitrofurazon, Furazolidon dan Furaltadon dengan konsentrasi tertentu disuntikkan ke HPLC minimal tiga kali, RSD waktu retensi tidak lebih dari 2%. Blanko sampel yang telah dipreparasi sesuai prosedur preparasi sampel di atas diinjeksikan ke HPLC, hasil kromatogram blanko tidak ada *peak* pada waktu retensi ( $R_t$ ) standar. Sampel *spiking* dengan campuran standar keempat analit golongan Nitrofurantoin, Nitrofurazon, Furazolidon dan Furaltadon dengan konsentrasi tertentu dipreparasi sesuai prosedur preparasi sampel di atas dan diinjeksikan ke HPLC, dilakukan *identity check* (match factor  $\geq 990$ ) dan *purity check* (purity factor  $\geq 990$ ).

#### 4.4.1.9. Uji Presisi dan Akurasi Metode

Larutan baku campuran dan larutan ekstrak blanko sampel yang diadisi dengan standar campuran diinjeksikan pada HPLC pada kondisi sesuai dengan hasil optimasi sebanyak 6 kali. Dari kromatogramnya selanjutnya ditentukan presisi dalam bentuk RSD (relative standard deviation). Akurasi metode ditentukan atas dasar persen perolehan kembali yakni kadar zat yang diperoleh dibandingkan dengan kadar zat yang ditambahkan dikalikan 100%.

#### 4.4.1.10. Uji Batas Deteksi (LOD)

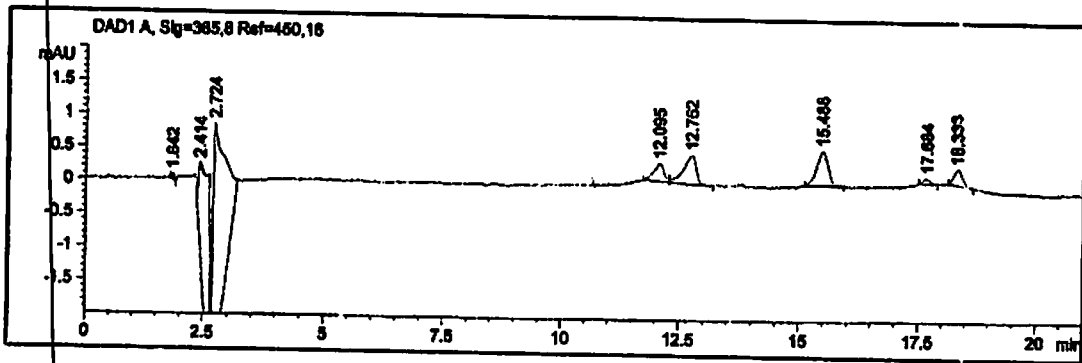
Larutan standar campuran disuntikkan ke HPLC dengan kondisi yang telah ditetapkan. Limit deteksi ditentukan dengan berdasarkan pada konsentrasi standar terkecil yang masih menghasilkan *peak* = 3 x *noise* dinyatakan dengan  $\mu\text{g/peak}$ . Prosedur yang sama dilakukan untuk golongan tetrasiklin.

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

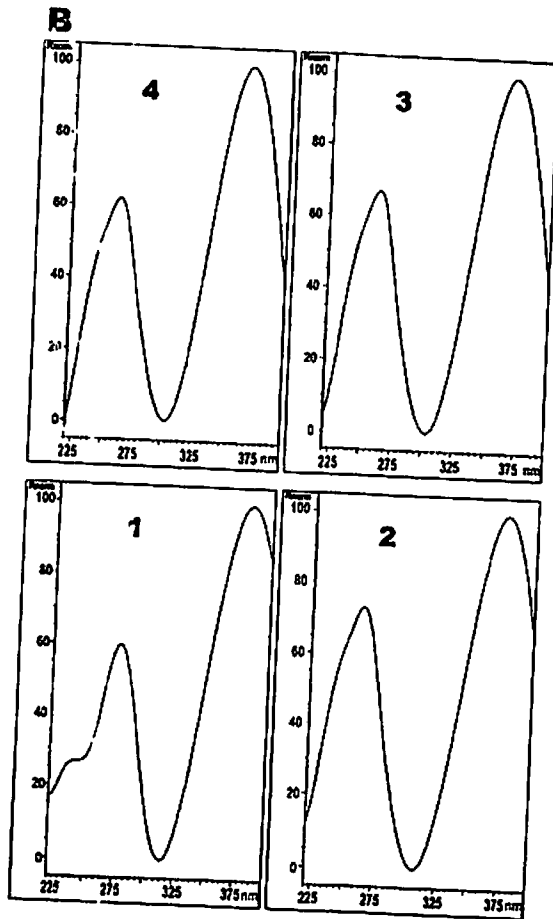
### A. ANTIBIOTIKA GOLONGAN NITROFURAN

#### 5.1.1. Kondisi optimum pemisahan antibiotika golongan nitrofuran

Optimasi metode merupakan salah satu tahap penting dalam pengembangan metode HPLC. Dalam penelitian ini, optimasi metode ditujukan untuk pemisahan empat campuran senyawa induk golongan nitrofuran (furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin, nitrofurazon). Kondisi yang optimum dicapai jika dihasilkan peak keempat senyawa tersebut terpisah dengan sempurna (harga  $R_s > 1,5$ ) dengan bentuk peak yang simetris ( $TF < 2$ ). Untuk mendapatkan kondisi optimum, larutan campuran keempat senyawa tersebut diinjeksikan ke dalam sistem HPLC dalam berbagai kondisi yakni dengan variasi jenis dan komposisi pelarut fase gerak, kecepatan fase gerak, jenis kolom dan suhu kolom. Dari beberapa kondisi yang dicoba, kondisi optimum pemisahan keempat derivat nitrofuran secara simultan didapatkan hasil seperti ditunjukkan pada gambar 5.1. Spektra UV masing-masing peak dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.1. Pemisahan antibiotika golongan nitrofuran secara HPLC  
Nitrofurantoin (RT: 12,095); Nitrofurazon (RT:12,762); Furazolidon (RT: 15,485); Furaltadon (RT: 18,333)



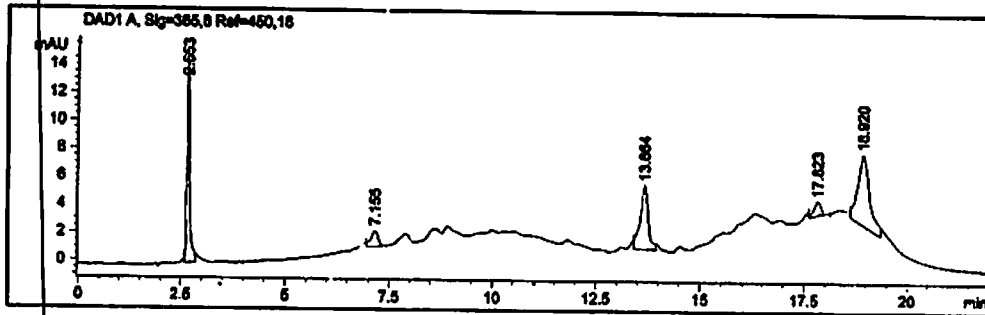
Gambar 5.2. Spektra UV dari standar Nitrofurantoin (1); Nitrofurazon (2); Furazolidon (3) dan Furaltadon (4)

Kondisi optimum HPLC yang digunakan untuk pemisahan keempat senyawa tersebut adalah sebagai berikut:

- Kolom : Lichrospher ODS RP-18, 4 x 250 mm, 5  $\mu$ m
- Fase gerak : Acetonitrile : Dapar phosphate pH 7 (elusi gradien)
- Panjang gelombang : 365 nm
- Suhu kolom : 30°C
- Kecepatan fase gerak : 1 ml/menit

### 5.1.2. Selektivitas Metode

Uji selektivitas atau spesifisitas metode diperlukan untuk mengetahui seberapa jauh metode yang dikembangkan ini mampu membedakan antara analit satu dengan analit yang lain atau antara analit dengan puncak-puncak lain yang terkandung di dalam matriks sampel. Gambar 5.3 menunjukkan kromatogram larutan ekstrak blanko sampel.



Gambar 5.3 Kromatogram larutan ekstrak blanko sampel

Dari gambar 5.3 dapat diketahui bahwa matriks sampel tidak menghasilkan puncak-puncak yang memiliki waktu retensi sama dengan puncak-puncak standar Nitrofurantoin (RT: 12,095); Nitrofurazon (RT:12,762); Furazolidon (RT: 15,485); Furaltadon (RT: 18,333).

Data perhitungan resolusi ( $R_s$ ) dan faktor selektivitas terhadap puncak-puncak Nitrofurantoin, Nitrofurazon, Furazolidon, dan Furaltadon pada tiga macam konsentrasi (0,1 ppm, 1 ppm dan 100 ppm) dapat dilihat pada tabel 5.1.

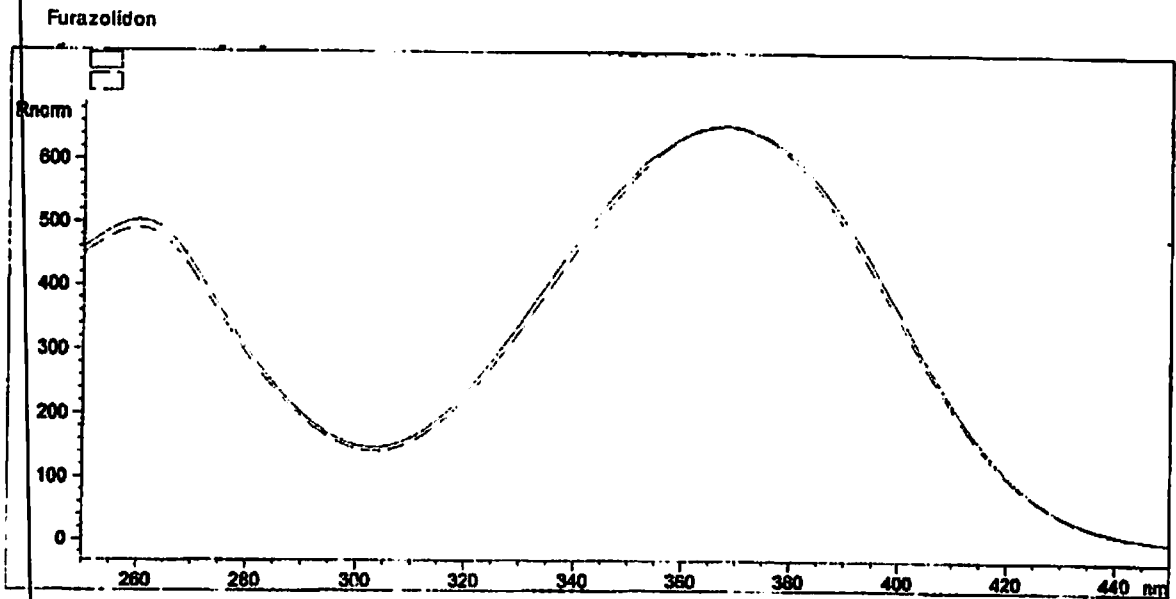


Tabel 5.1. Data hasil analisis HPLC campuran standar keempat analit golongan Nitrofurantoin, Nitrofurazon, Furazolidon, dan Furaltadon dengan konsentrasi 0,1 ppm, 1 ppm dan 100 ppm

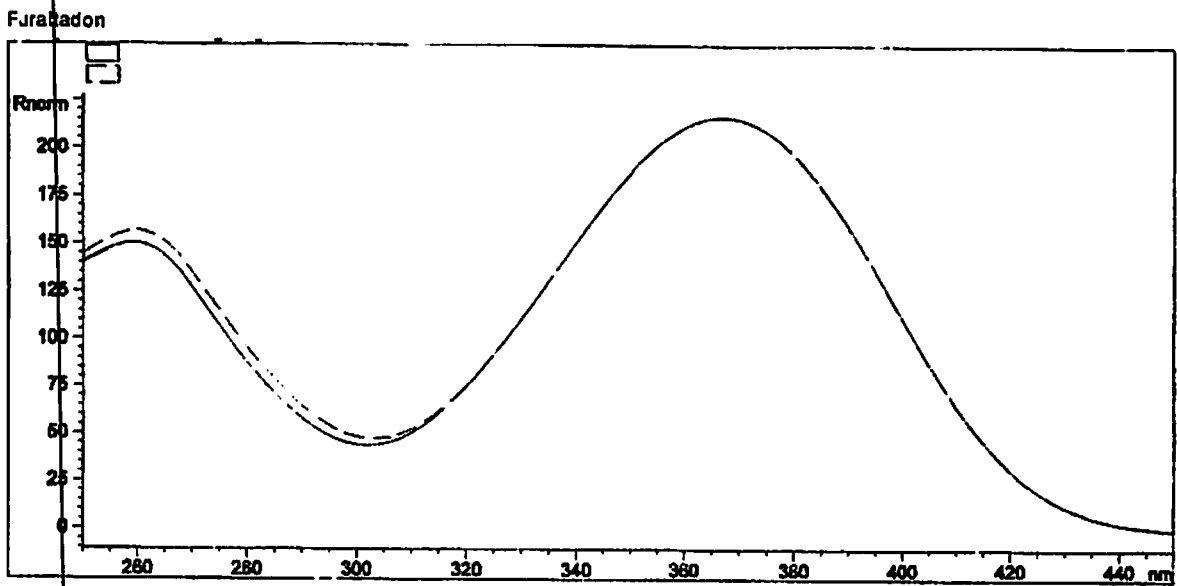
Nama analit	Nitrofurantoin			Nitrofurazon			Furazolidon			Furaltadon		
	0,1	1	100	0,1	1	100	0,1	1	100	0,1	1	100
Konsentrasi (ppm)	0,1	1	100	0,1	1	100	0,1	1	100	0,1	1	100
Resolusi (Rs)	15,2	31,6	31,4	1,6	1,5	1,6	6,0	6,0	6,5	2,0	1,7	1,8
Faktor Selektivitas	4,4	4,5	4,5	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,0	1,1	1,0
RSD waktu retensi	0,08 %			0,05 %			0,01 %			0,003 %		

Dari table 5.1 dapat diketahui bahwa resolusi masing-masing puncak analit diperoleh harga  $> 1,5$  dengan factor selektivitas masing-masing  $> 1$ . Hal ini berarti bahwa masing-masing puncak analit terpisah dengan baik.

Untuk mengetahui apakah masing-masing peak analit dalam sampel sama (identik) dengan peak standar, maka dilakukan overlay spectra UV seperti yang dapat dilihat pada gambar 5.4, 5.5, 5.6, dan 5.7.

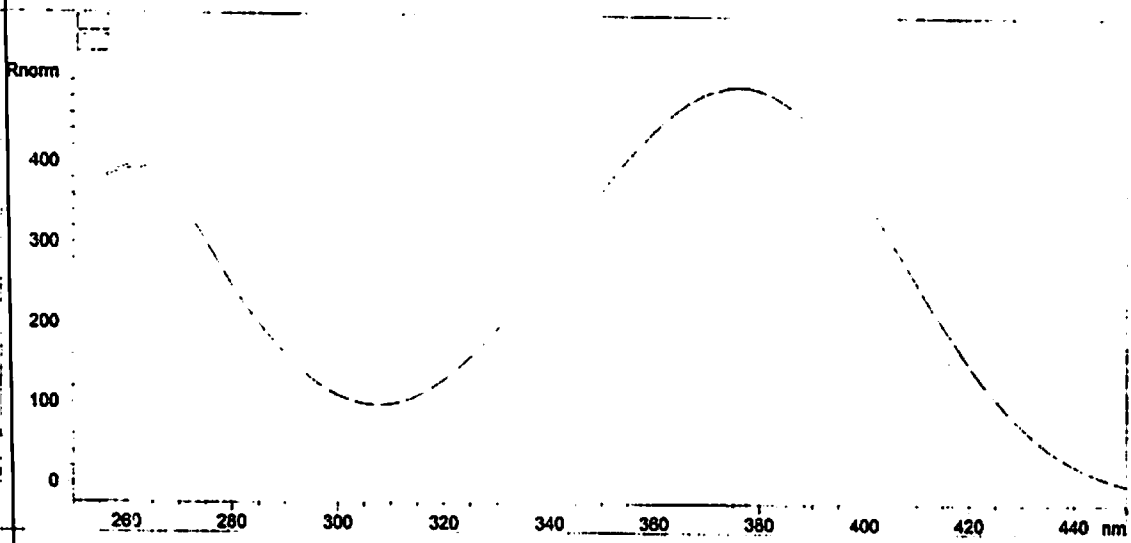


Gambar 5.4. Overlay spectra standar Furazolidon dan spectra furazolidon yang ditambahkan ke dalam blanko sampel



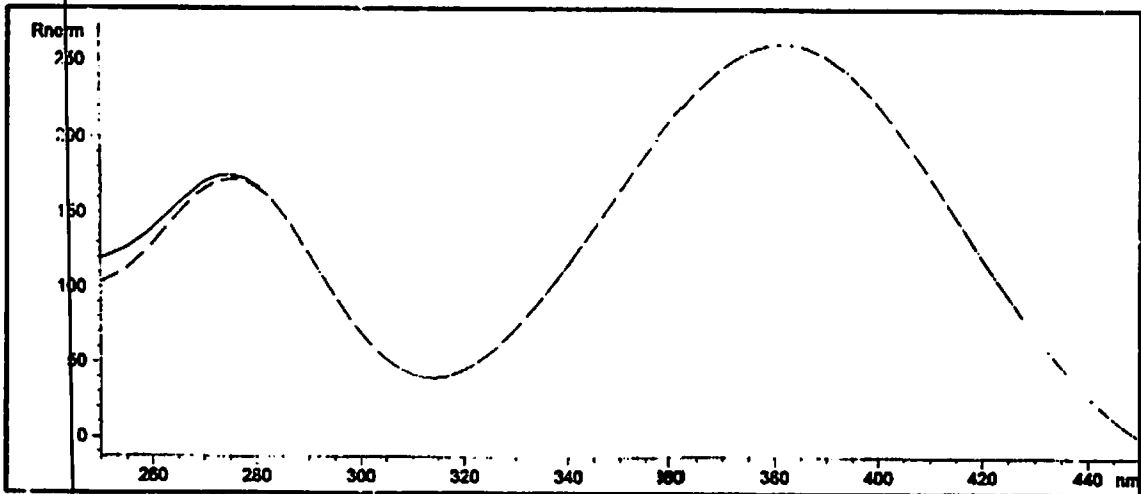
Gambar 5.5. Overlay spectra standar furaltadone dan spektra furaltadone yang ditambahkan ke dalam blanko sampel

Nitrofurazon



Gambar 5.6. Overlay spectra standar Nitrofurazon dan spektra nitrofurazon yang ditambahkan ke dalam blanko sampel

Nitrofurantoin



Gambar 5.7. Overlay spektra standar nitrofurantoin dan spektra nitrofurantoin yang ditambahkan ke dalam blanko sampel

Gambar 5.5. sampai 5.7 menunjukkan bahwa spektra UV antara puncak masing analit antara standar dengan standar yang ditambahkan ke dalam sampel memiliki profil sama. Harga Match Factor (MF) dan purity factor dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Harga Match Factor (MF) dan purity factor

Nama analit	Nitrofurantoin	Nitrofurazon	Furazolidon	Furaltadon
Match factor	999,652	999,975	999,832	999,892
Purity factor	999,714	999,830	999,380	997,985

Match factor factor seperti yang ditunjukkan tabel 5.2 memiliki harga lebih besar 990 untuk masing-masing analit (nitrofurantoin, nitrofurazon, furazolidon dan furaltadone). Hal ini berarti bahwa peak standar dan peak sampel bersifat identik. Berdasarkan harga purity factor untuk masing-masing peak yang juga lebih besar daripada 990 dapat disimpulkan bahwa peak-peak tersebut bersifat murni (pure) atau tidak terkontaminasi oleh peak-peak lain.

### 5.1.3. Presisi dan Akurasi Metode

Pada uji presisi dan akurasi diperoleh hasil seperti yang tercantum dalam tabel 5.3.

Tabel 5.3. Data presisi dan akurasi metode (n = 3)

Analit	Nitrofurantoin	Nitrofurazon	Furazolidon	Furaltadon
Rata-Rata % recovery	28,88	29,78	50,97	42,96
SD	3,150	2,411	6,432	4,120
RSD	10.9	8.1	12.6	9.6

Berdasarkan data tabel 5.3., RSD masing-masing analit tidak melebihi dari 20%. Akurasi pada furazolidon diperoleh persen recovery 50,97% yang cukup memadai untuk analisis residu, sedangkan untuk analit-analit lainnya pada hasil percobaan ini masih diperoleh persen recovery tidak melebihi 50%.

#### 5.1.4. Batas Deteksi Metode

Pada analisis residu antibiotika dalam udang, batas deteksi memegang peran yang sangat penting. Batas deteksi ditentukan dengan cara menginjeksikan larutan campuran analit dalam konsentrasi yang semakin kecil yakni 1,00 ppm; 0,08 ppm; 0,06 ppm; 0,05 ppm; 0,025 ppm dan 0,01 ppm dengan volum injek 20  $\mu$ L. Batas deteksi ditentukan atas dasar  $S/N > 3$  yang dinyatakan dalam  $\mu$ g/peak. Hasil uji batas deteksi (LOD) diperoleh hasil seperti yang dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.4. Data Batas Deteksi

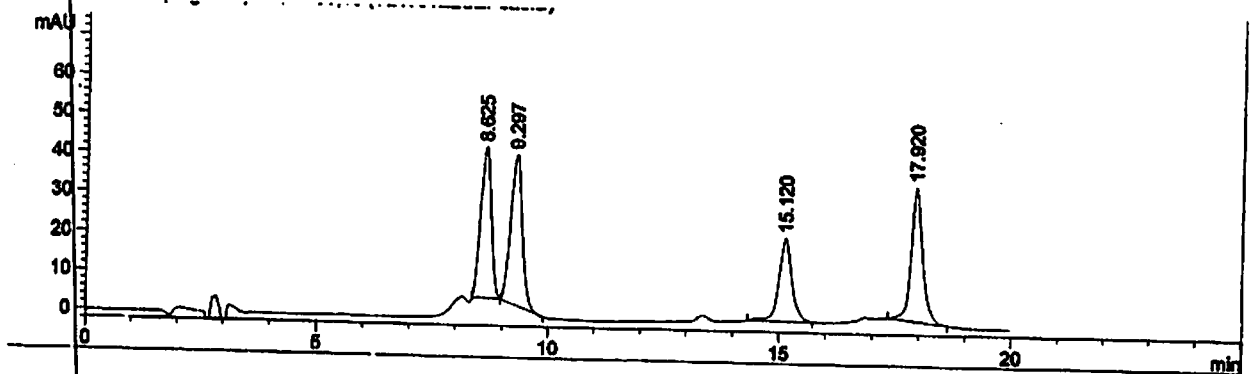
Analit	Batas deteksi Alat (volum injeksi 20 $\mu$ L)
Nitrofurantoin	0,0005 $\mu$ g/peak
Nitrofurazon	0,0005 $\mu$ g/peak
Furazolidon	0,0005 $\mu$ g/peak
Furaltadon	0,0008 $\mu$ g/peak

Agar diperoleh batas deteksi metode sama dengan atau lebih kecil daripada 0,1 ppb dalam sampel udang, berdasarkan data tersebut di atas dapat dihitung penggunaan sampel yang diperlukan sesuai % recovery masing-masing analit. Penggunaan sampel 1000 g berat basah, batas deteksi nitrofurantoin, nitrofurazone, furazolidone dan furaltadone berturut-turut adalah 0,087 ppb; 0,084 ppb; 0,049 ppb dan 0,093 ppb. Bobot sampel udang dapat diperkecil seperlima nya (200 g) jika digunakan volum injek 100  $\mu$ L.

## B. ANTIBIOTIKA GOLONGAN TETRASIKLIN

### 5.2.1. Kondisi optimum pemisahan antibiotika golongan tetrasiklin

Pada pemisahan golongan tetrasiklin secara simultan diperoleh kondisi optimum pemisahan oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin seperti yang ditunjukkan Gambar 5.8.



Gambar 5.8. Pemisahan antibiotika golongan tetrasiklin secara HPLC. Waktu retensi Oksitetrasiklin=8,625; Tetrasiklin = 9,297; Klortetrasiklin=15,120; Doksisisiklin=17,920.

Kondisi HPLC:

HPLC : Agilent 1100 Series, Autosampler, DAD detektor

Kolom : Hypersil BDS C-18 4.6x250mm 5 mikron

Fase gerak : Acetonitrile : Dapar phosphate pH 7 (elusi gradien)

Panjang gelombang : 350 nm

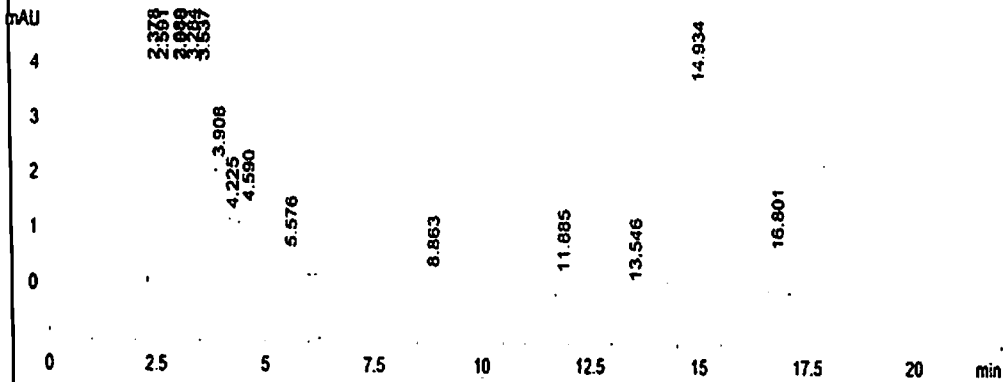
Suhu kolom : 30°C

Kecepatan fase gerak: 1 ml/menit

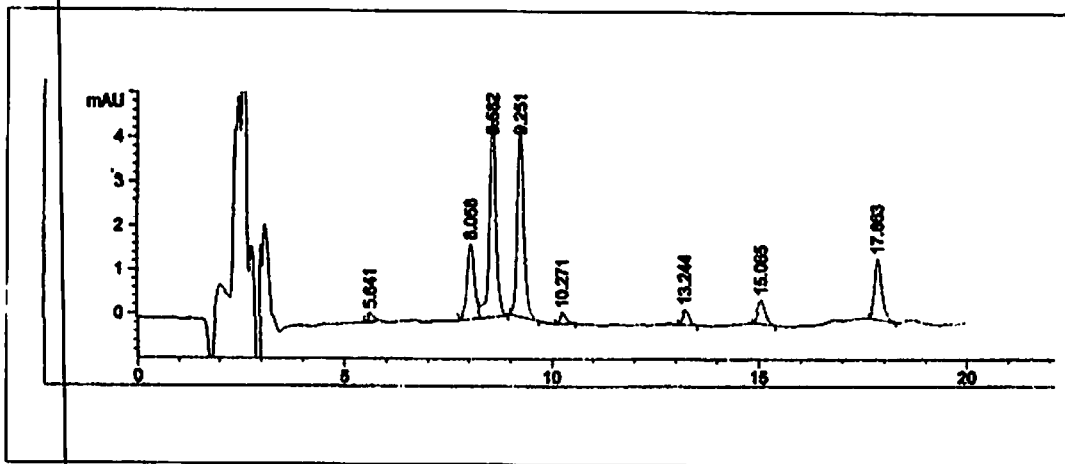
Volume injek : 20 uL

### 5.2.2. Selektivitas Metode

Gambar 5.9 menunjukkan kromatogram larutan ekstrak blanko sampel udang, sedangkan gambar 5.10 menunjukkan kromatogram standar yang ditambahkan ke dalam matrik sampel. Data selektivitas dapat dilihat pada tabel 5.5.



Gambar 5.9 menunjukkan kromatogram larutan ekstrak blanko sampel



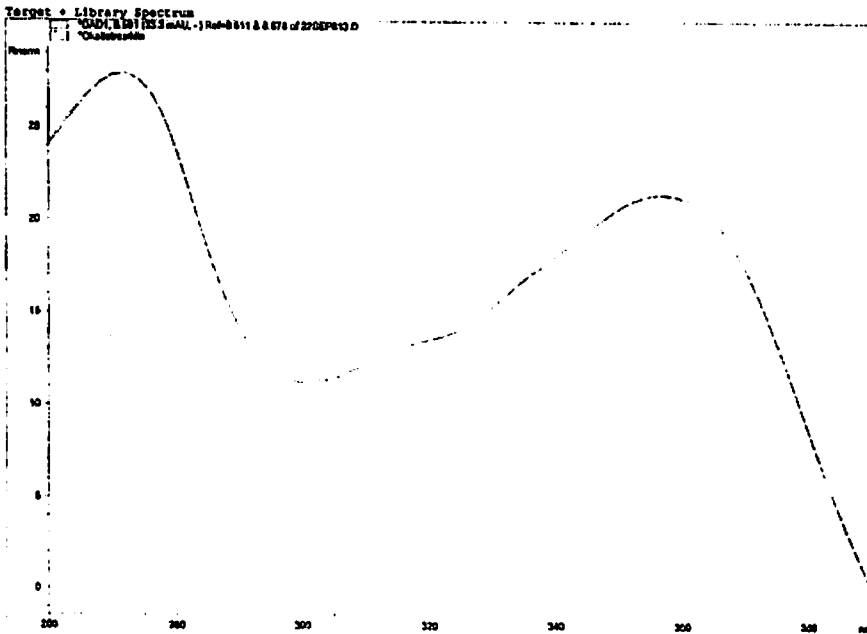
Gambar 5.10 kromatogram standar yang ditambahkan ke dalam matrik sampel.

**Tabel 5.5. Data selektivitas HPLC untuk standar keempat analit golongan Tetrasiklin yang ditambahkan ke dalam matriks sampel**

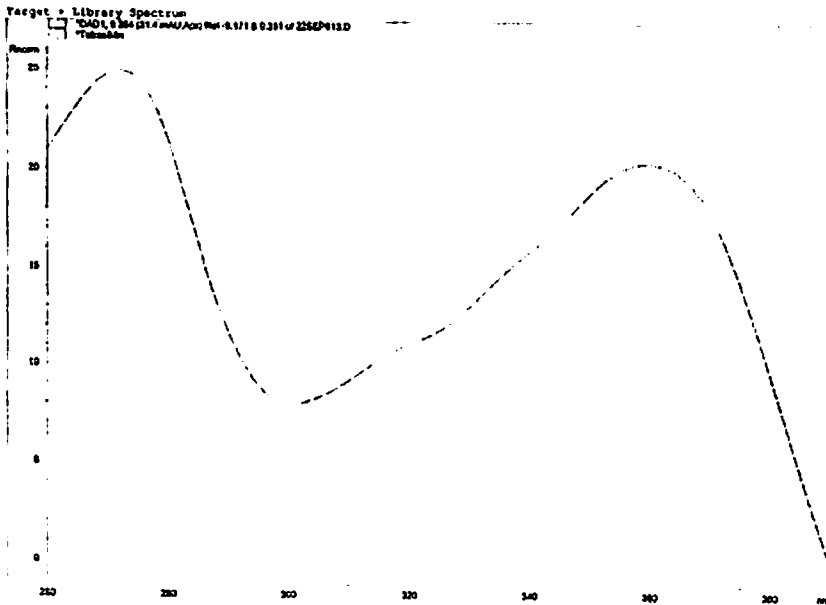
Waktu retensi (min)	Angka simetri	Resolusi	Selektivitas
5.641	0,69	-	-
8.058	0,98	9,10	1,43
8.582	0,94	1,84	1,07
9.251	0,76	2,50	1,08
10,271	0,81	3,69	1,11
13,244	0,80	10,59	1,29
15,065	0,85	6,15	1,14
17,863	0,75	8,97	1,19

Berdasarkan tabel 5.5 dapat diketahui bahwa peak-peak yang dihasilkan pada kondisi ini bersifat simetri yang dibuktikan dengan angka simetri pada rentang antara 0,5 sampai dengan 2. Peak-peak juga terpisah dengan baik dengan harga resolusi lebih besar daripada 1,5. Gambar 5.11 sampai dengan 5.15 menunjukkan overlay spectra standar dan spectra standar yang ditambahkan ke dalam blanko sampel.

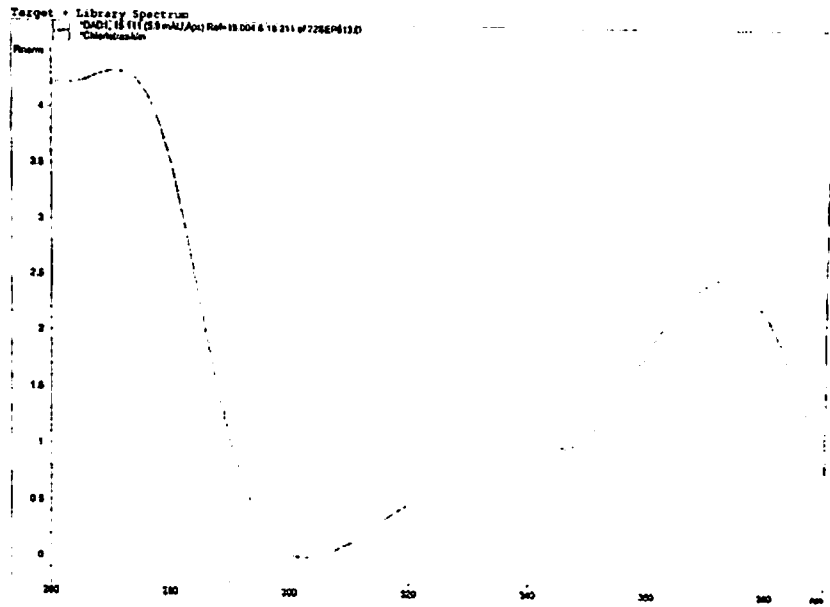




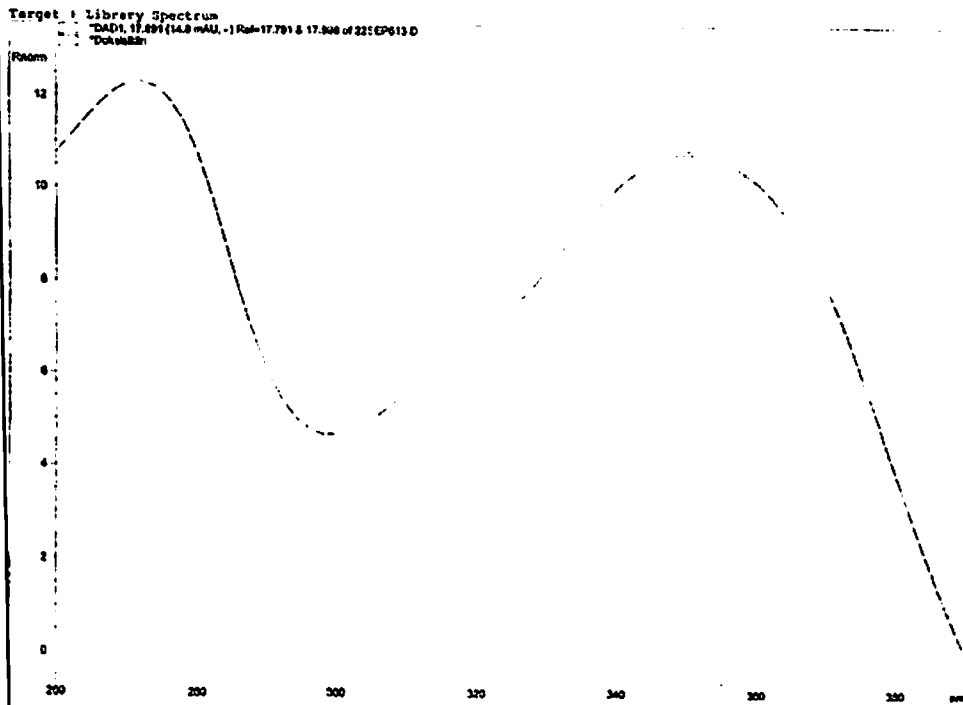
Gambar 5.11. Overlay spectra standar Oksitetrasiklin dan spectra Oksitetrasiklin yang ditambahkan ke dalam blanko sample



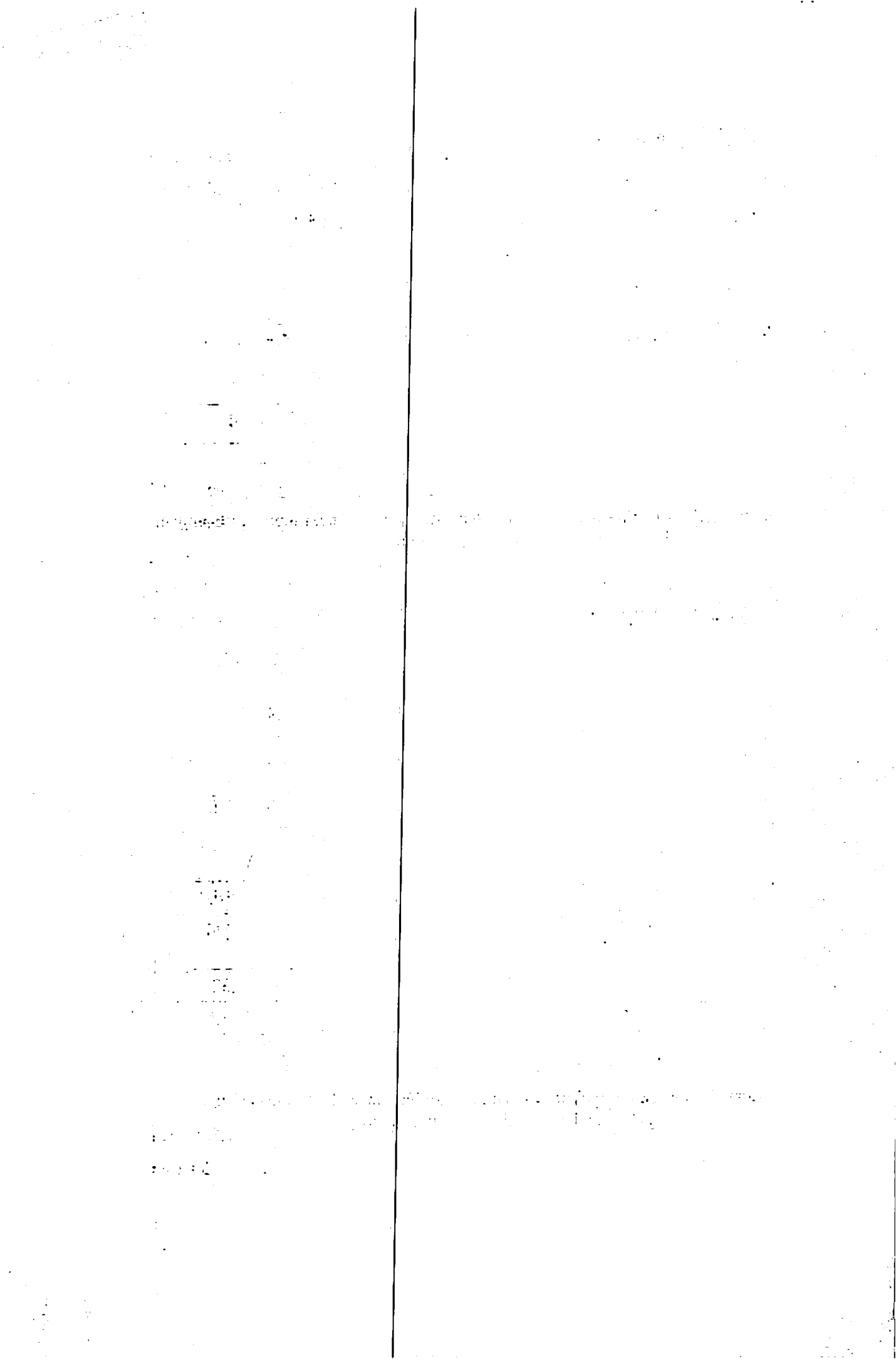
Gambar 5.12. Overlay spectra standar tetrasiklin dan spektra tetrasiklin yang ditambahkan ke dalam blanko sampel



Gambar 5.13. Overlay spectra standar Nitrofurazon dan spektra nitrofurazon yang ditambahkan ke dalam blanko sampel



Gambar 5.14. Overlay spektra standar doksisisiklin dan spektra doksisisiklin yang ditambahkan ke dalam blanko sampe



Gambar 5.11. sampai 5.14 menunjukkan bahwa spektra UV antara puncak masing analit antara standar dengan standar yang ditambahkan ke dalam sampel memiliki profil sama. Harga Match Factor (MF) dan purity factor dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.6. Harga Match Factor (MF) dan purity factor

Nama analit	Oksitetrasiklin	Tetrasiklin	Klortetrasiklin	Doksisiklin
Match factor	999,911	999,939	999,725	999,934
Purity factor	996,227	999,546	999,560	999,401

Match factor factor seperti yang ditunjukkan table 5.6 memiliki harga lebih besar 990 untuk masing-masing analit (oksitetraiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisiklin). Hal ini berarti bahwa peak standar dan peak sampel bersifat identik. Berdasarkan harga purity factor untuk masing-masing peak yang juga lebih besar daripada 990 dapat disimpulkan bahwa peak-peak tersebut juga bersifat murni (pure) atau tidak terkontaminasi oleh peak-peak lain.

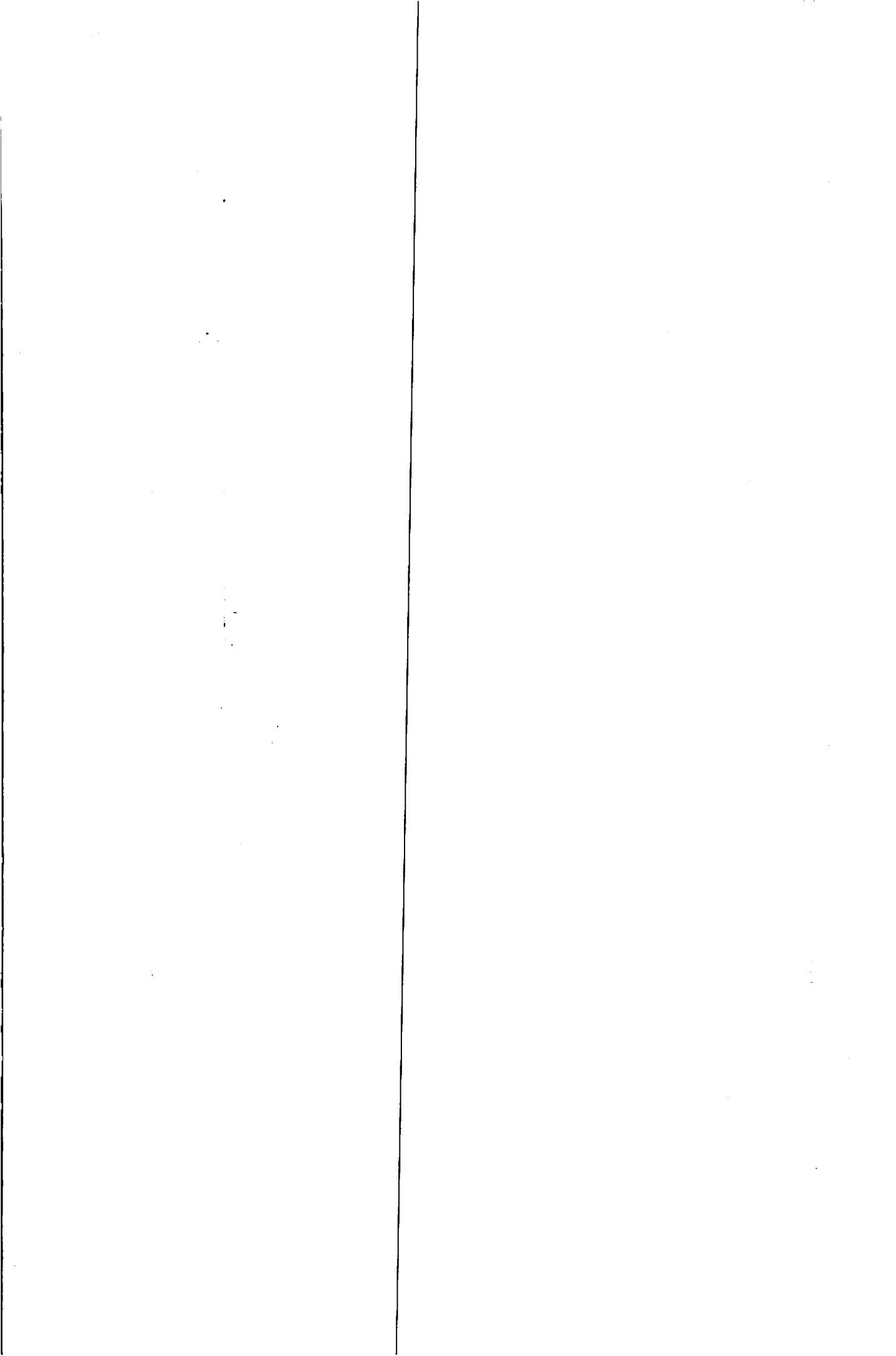
### 5.1.3. Presisi dan Akurasi Metode

Pada uji presisi dan akurasi diperoleh hasil seperti yang tercantum dalam tabel 5.7.

Tabel 5.7. Data presisi dan akurasi metode (n = 6)

Analit	Oksitetrasiklin	Tetrasiklin	Klortetrasiklin	Doksisiklin
Rata-Rata % recovery	76,33	72,13	31,88	54,96
SD	1,10	1,35	1,64	1,32
RSD	1,44	1,87	5,15	2,40

Berdasarkan data tabel 5.7, RSD masing-masing analit tidak melebihi dari 10%. Akurasi pada furazolidon diperoleh persen recovery antara mencapai > 70% untuk oksitetrasikoin dan tetrasiklin, sedangkan untuk klortetrasiklin dan doksisiklin berturut-turut 31,88% dan 54,96%. Hasil recovery ini diperoleh untuk ekstrak sampel sebelum melalui clean-up



dengan SPE. Setelah melalui clean-up dengan SPE ternyata hasil yang diperoleh menjadi jauh lebih kecil, yakni 18,72%; 19,23%; 9,24% dan 15,74% berturut-turut untuk oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin.

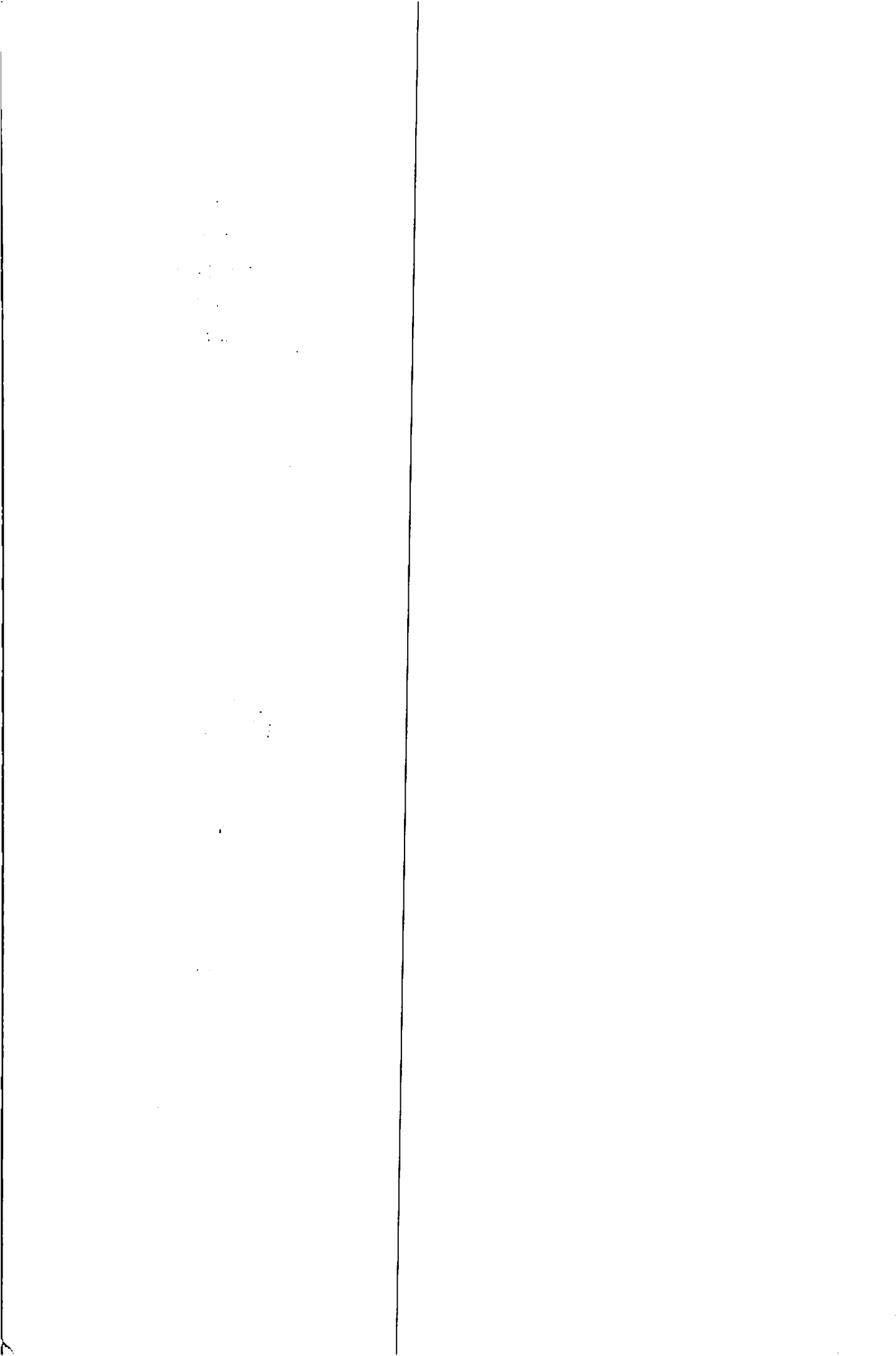
#### 5.1.4. Batas Deteksi Metode

Hasil uji batas deteksi (LOD) diperoleh hasil seperti yang dapat dilihat pada table 5.8.

Tabel 5.8. Data Batas Deteksi

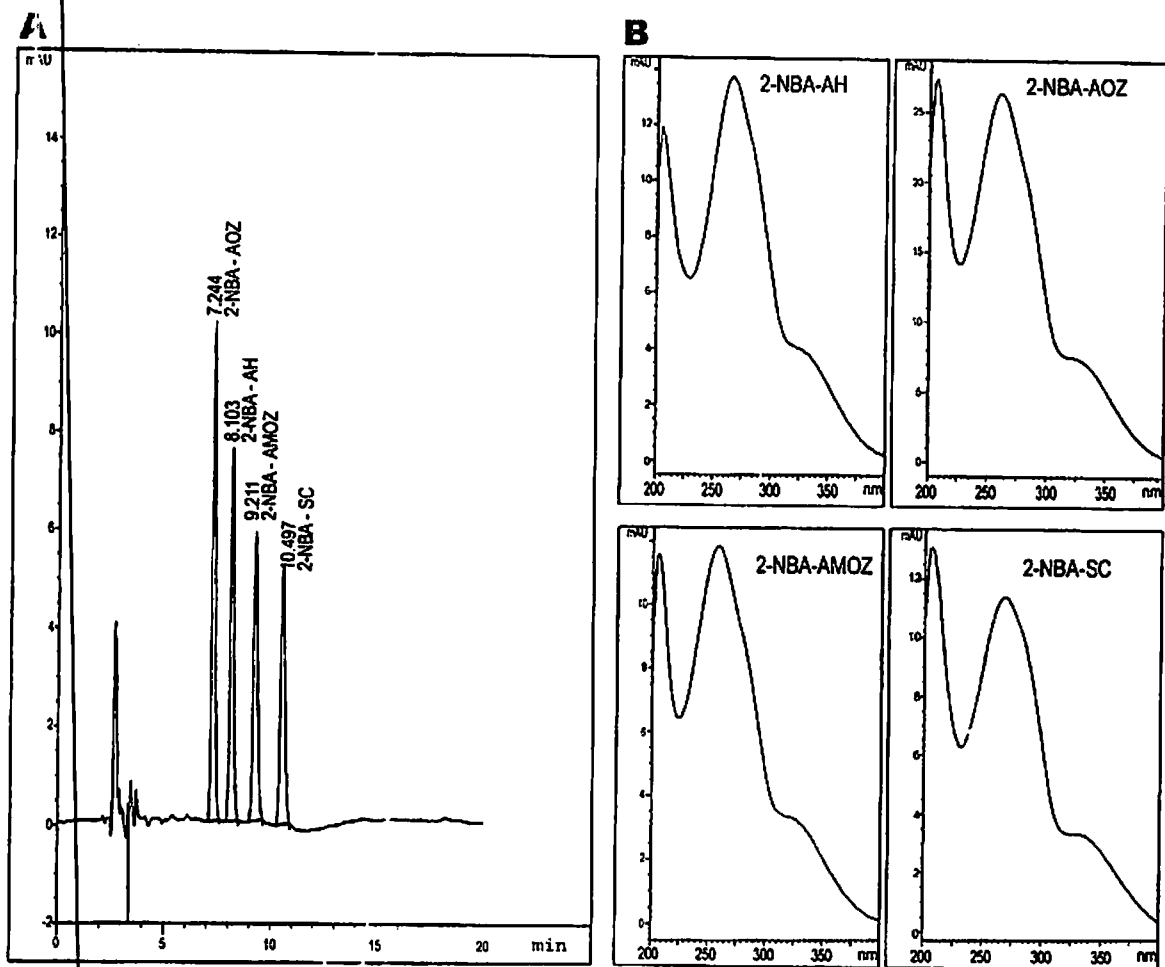
Analit	Batas deteksi Alat (volum injeksi 20 $\mu$ L)
Oksitetrasiklin	0,0030 $\mu$ g/peak
Tetrasiklin	0,0026 $\mu$ g/peak
Klortetrasiklin	0,0048 $\mu$ g/peak
Doksisisiklin	0,0040 $\mu$ g/peak

Agar diperoleh batas deteksi metode lebih kecil atau sama dengan 1 ppb dalam sampel udang, berdasarkan data tersebut di atas dapat dihitung penggunaan sampel yang diperlukan sesuai % recovery masing-masing analit seperti pada penentuan limit deteksi golongan nitrofurantoin.



### C. METABOLIT ANTIBIOTIKA GOLONGAN NITROFURAN

Metabolit nitrofuran yang meliputi AOZ, AMOZ, SC dan AH dipisahkan setelah diderivatisasi terlebih dahulu dengan 2-Nirobenzaldehida. Hasil derivatisasi masing-masing metabolit adalah 2-NBA-AOZ; 2-NBA-AMOZ; 2-NBA-SC, dan 2-NBA-AH. Pada penelitian ini diperoleh kondisi optimum pemisahan metabolit golongan nitrofuran secara simultan yakni AOZ, AMOZ, SC dan AH ditunjukkan Gambar 5.15.



Gambar 5.15. Pemisahan metabolit antibiotika golongan nitrofuran secara HPLC (A: kromatogram HPLC hasil derivatisasi metabolit nitrofur, B: Spektra UV hasil derivatisasi metabolit nitrofur)

Berdasarkan gambar 5.15 A, hasil derivatisasi keempat metabolit nitrofur dapat terpisah dengan baik ( $R_s > 1,5$ ).



1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is essential for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part of the document outlines the specific procedures and protocols that must be followed when recording transactions. It details the steps involved in data collection, verification, and reporting, ensuring that all information is accurate and reliable.

3. The third part of the document addresses the challenges and risks associated with maintaining accurate records. It identifies common pitfalls such as data entry errors, incomplete information, and lack of oversight, and provides strategies to mitigate these risks.

4. The fourth part of the document discusses the role of technology in improving record-keeping processes. It explores various software solutions and digital tools that can streamline data collection, storage, and analysis, enhancing efficiency and accuracy.

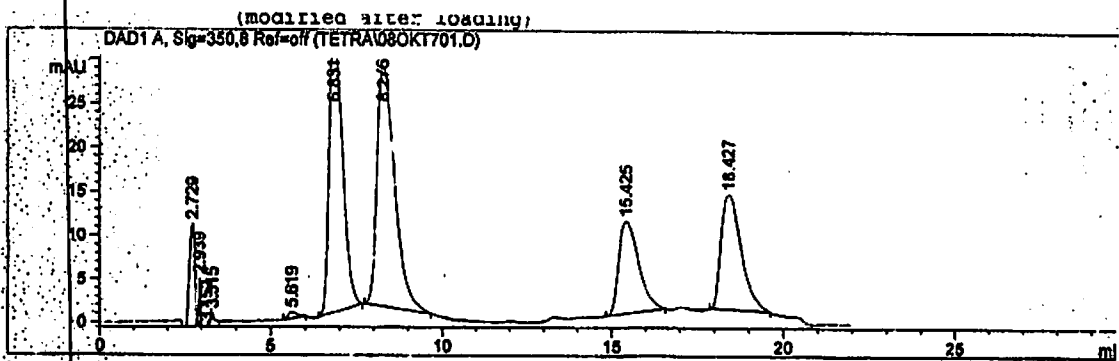
5. The fifth part of the document concludes by summarizing the key points and reiterating the importance of consistent and accurate record-keeping for the long-term success and integrity of the organization.

6. The final part of the document provides a list of resources and references for further information on record-keeping practices, including industry standards, best practices, and relevant legislation.

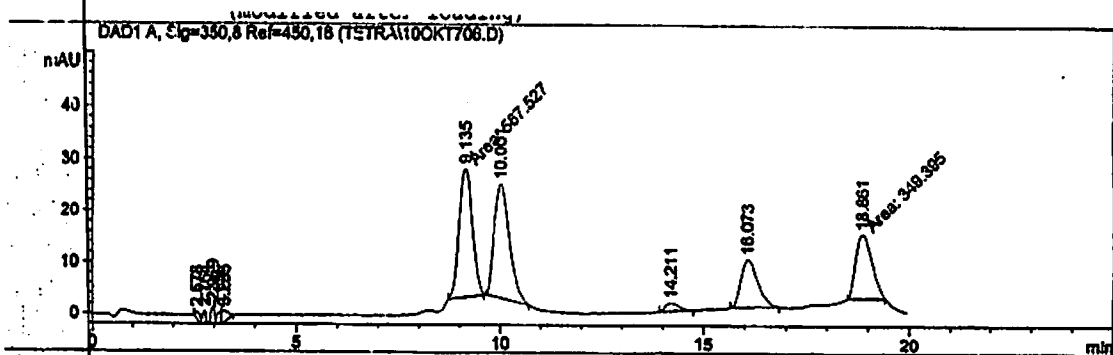
#### D. METABOLIT GOLONGAN TETRASIKLIN

Mengingat bahwa bahan pembanding metabolit golongan tetrasiklin sangat sulit diperoleh di pasaran, maka selektivitas metode dilakukan dengan cara menyimpan sampel selama beberapa waktu tertentu. Dalam hal ini, campuran tetrasiklin, oksitetrasiklin, chlor tetrasiklin dan doksisisiklin disimpan pada suhu kamar selama beberapa hari.

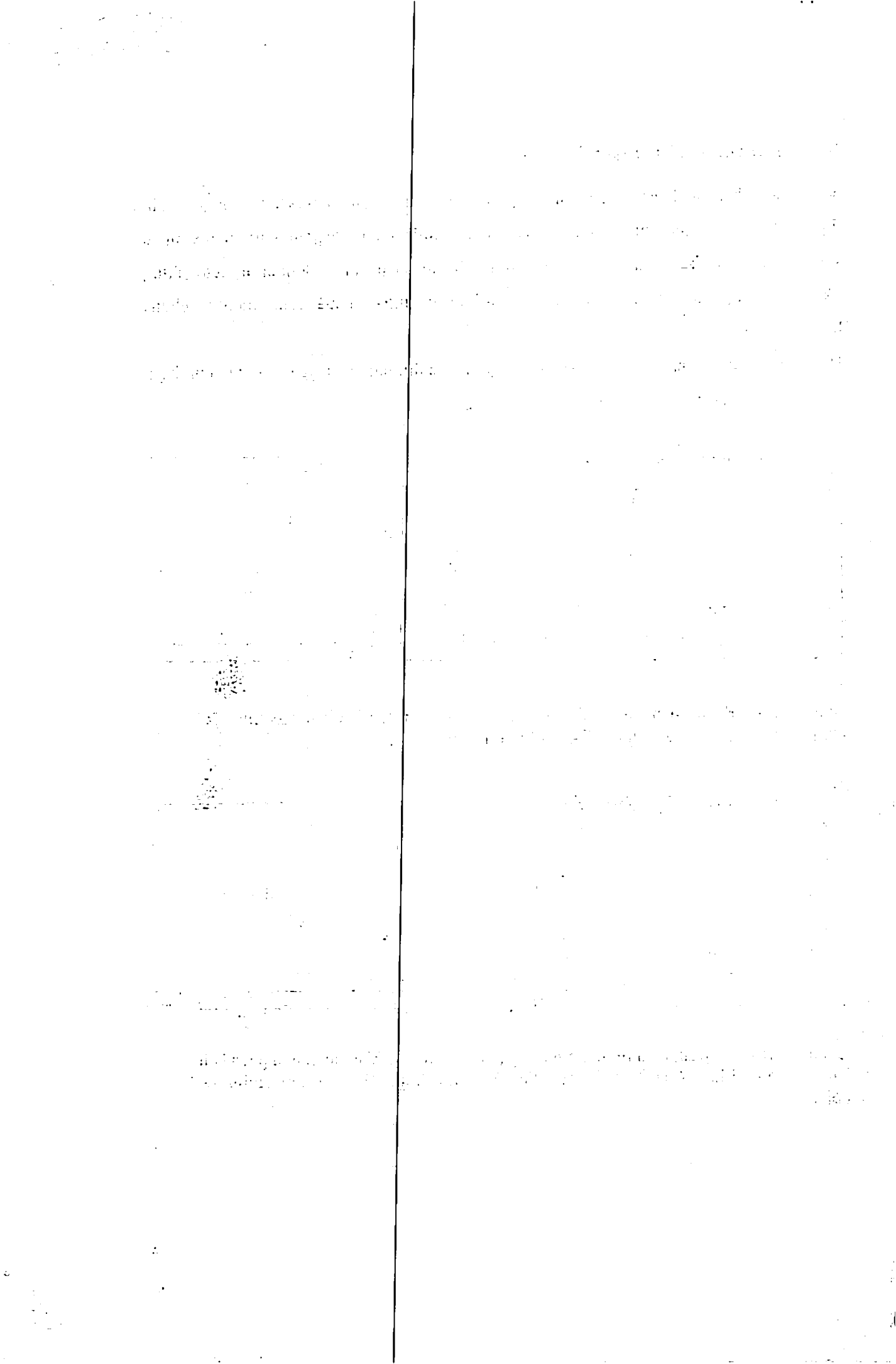
Hasil pemisahan campuran antibiotika golongan tetrasiklin bentuk senyawa induk dan hasil degradasi dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



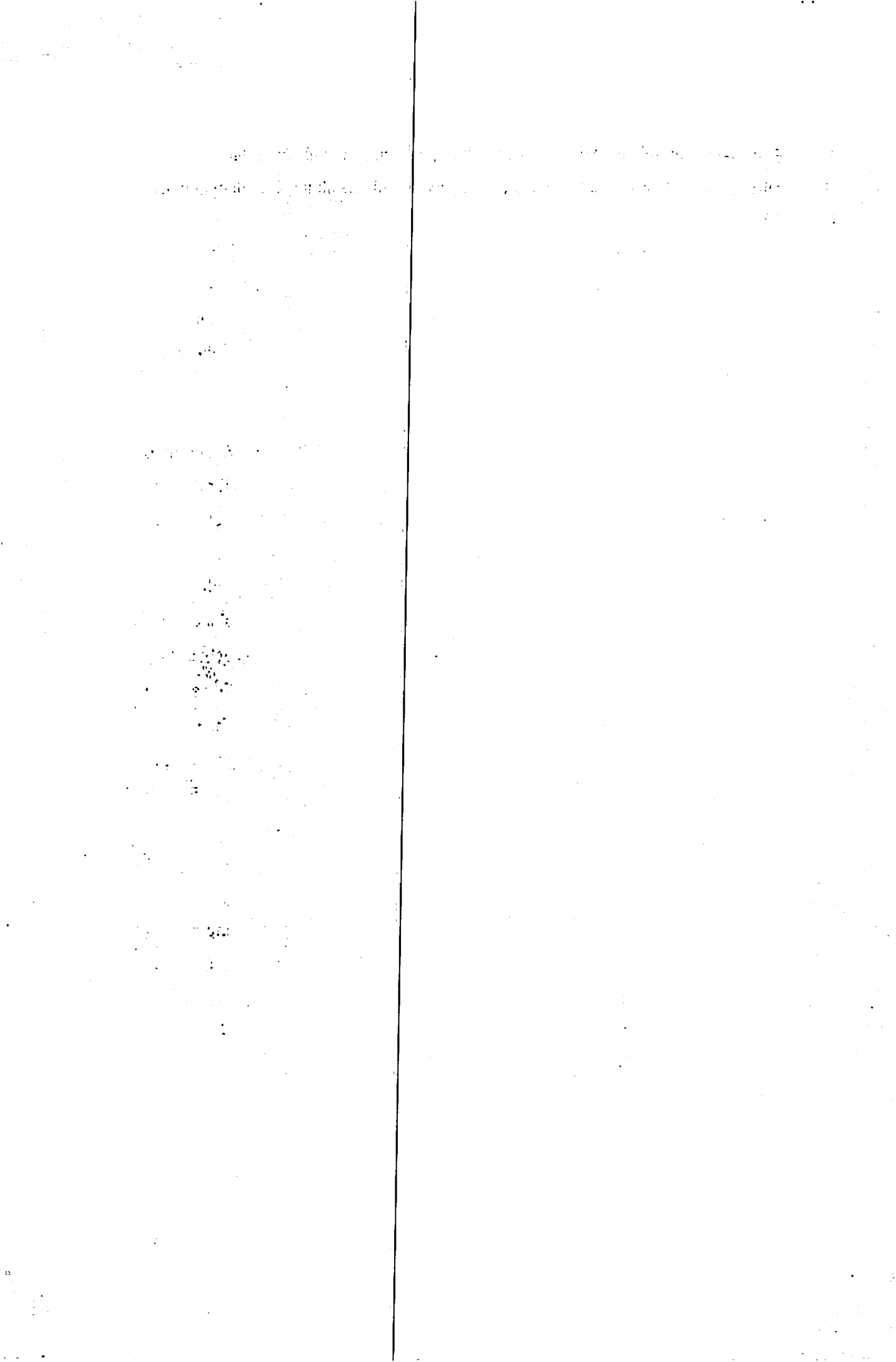
Gambar 5.16. Pemisahan antibiotika golongan tetrasiklin (OTC: oksitetrasiklin; TC: tetrasiklin; CTC: klortetrasiklin; DC: doksisisiklin) hari ke-1



Gambar 5.17. Pemisahan antibiotika golongan tetrasiklin setelah disimpan pada suhu kamar selama 3 hari. (OTC: oksitetrasiklin; TC: tetrasiklin; CTC: klortetrasiklin; DC: doksisisiklin)



Hasil percobaan menunjukkan bahwa sampai 3 hari penyimpanan bahwa mulai terdeteksinya peak pada RT 14.21, peak-peak senyawa induk masih terpisah dengan baik ( $R_s > 1.5$ ).

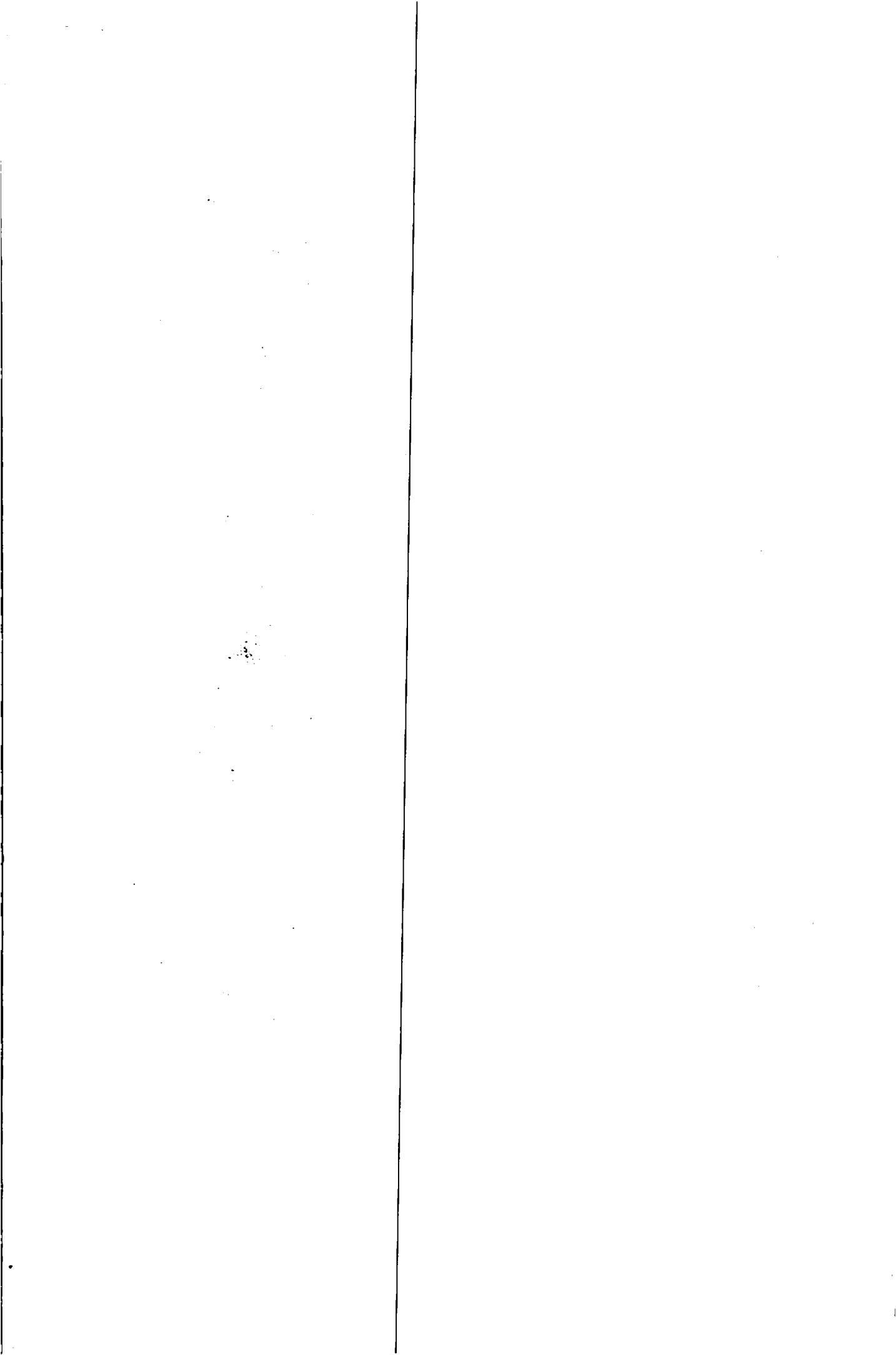


## BAB V

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Penggunaan metode ekstraksi dan clean-up yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan persen recovery yakni 28,88%; 29,78%; 50,97% dan 42,96% berturut-turut untuk nitrofurantoin, nitrofurazon, furazolidon dan furaltadon. Sedangkan untuk golongan tetrasiklin yakni oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin diperoleh % recovery berturut-turut 76,33%; 72,13%; 31,88% dan 54,96%
2. Diperoleh kondisi optimum HPLC untuk pemisahan antibiotika secara simultan senyawa induk dan metabolit untuk golongan nitrofuran (furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin, nitrofurazon) dan golongan tetrasiklin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin). Kondisi optimum HPLC untuk pemisahan residu antibiotika golongan nitrofuran tercapai dengan menggunakan kolom Lichrospher ODS RP-18, 4 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Fase gerak : Acetonitrile : Dapar phosphate pH 7 (elusi gradien), Panjang gelombang: 365 nm, suhu kolom : 30°C dan kecepatan fase gerak: 1 ml/menit. Sedangkan kondisi optimum untuk golongan tetrasiklin tercapai dengan menggunakan kolom: Hypersil BDS C-18 4.6x250mm 5 mikron, fase gerak: Acetonitrile : Dapar phosphate pH 7 (elusi gradien), Panjang gelombang : 350 nm, Suhu kolom : 30°C, Kecepatan fase gerak: 1 ml/menit. Pemisahan metabolit nitrofuran diperoleh dengan cara derivatisasi terlebih dahulu dengan 2-nitrobenzaldehida.
3. Limit deteksi untuk golongan nitrofuran adalah 0,0005  $\mu\text{g/peak}$  masing-masing berturut-turut untuk nitrofurantoin, nitrofurazone, dan furazolidone, dan 0,0008  $\mu\text{g/peak}$  untuk furaltadone. Limit deteksi untuk golongan tetrasiklin adalah 0,0030; 0,0026; 0,0048; 0,0040  $\mu\text{g/peak}$  berturut-turut untuk oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin dan doksisisiklin.



## **SARAN**

Penggunaan sampel dalam jumlah relatif besar diperlukan untuk mencapai batas deteksi yang kecil.



THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

DEPARTMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA

OFFICE OF THE DISTRICT COMMISSIONER

## DAFTAR PUSTAKA

1. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products. *Furazolidone summary report*. <http://www.emea.eu.int./pdfs/vet/mrls/Furazolidone.pdf> (accessed on January 2006).
2. *United States Pharmacopoeia 28*, United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2005, 875, 1380-1384.
3. Alawi, M.A. Analysis of furazolidone and furaltadone in chicken tissues and eggs using Modified HPLC/ELCD Method. *Fresenius Envir. Bull.* 2000, 9, 508-514.
4. McCracken, R.J.; Kennedy, D.G. Bioavailability of residues of the furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in porcine tissues and the effects of cooking upon residue concentrations. *Food Addit. Contam.* 1997, 14, 507-513.
5. Commission Decision 2003/181/EC, 13 March 2003, amending decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum performance limits (MRPLs) for certain residues in food animal origin, *Off. J. Eur. Communities* 2003, L71, 17.
6. Franek, M; Hruska, K. Antibody based methods for environmental and food analysis: a review. *Vet. Med. Czech.* 2005, 50, 1-10.
7. Degroodt, J. M.; Wyhowski de Bukanski, B.; De Groof, J.; Beernaert, H.; Srebrnik, S. Chloramphenicol and nitrofurantoin residue analysis by HPLC and photodiode array detection in meat and fish. *Journal of Liquid Chromatography* 1992, 15, 2355-2371.
8. Galeano Diaz T.; Guibertau Cabanillas, A.; Acedo Valenzuela, M. I.; C. A.; Salinas, F. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal Chromatogr, A*, 1997, 764, 243-248.
9. Muth, P.; Metz P.; Siems B.; Bolten W.W.; Vergin H. Sensitive determination of nitrofurantoin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1996, 729, 251-258.
10. Hormazabal, V.; Yndestad, M. Simple and rapid method of analysis for furazolidone in meat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 1995, 18, 1871-1877.

1891

1891

1. The first part of the report  
 2. The second part of the report  
 3. The third part of the report  
 4. The fourth part of the report  
 5. The fifth part of the report  
 6. The sixth part of the report  
 7. The seventh part of the report  
 8. The eighth part of the report  
 9. The ninth part of the report  
 10. The tenth part of the report  
 11. The eleventh part of the report  
 12. The twelfth part of the report  
 13. The thirteenth part of the report  
 14. The fourteenth part of the report  
 15. The fifteenth part of the report  
 16. The sixteenth part of the report  
 17. The seventeenth part of the report  
 18. The eighteenth part of the report  
 19. The nineteenth part of the report  
 20. The twentieth part of the report  
 21. The twenty-first part of the report  
 22. The twenty-second part of the report  
 23. The twenty-third part of the report  
 24. The twenty-fourth part of the report  
 25. The twenty-fifth part of the report  
 26. The twenty-sixth part of the report  
 27. The twenty-seventh part of the report  
 28. The twenty-eighth part of the report  
 29. The twenty-ninth part of the report  
 30. The thirtieth part of the report  
 31. The thirty-first part of the report  
 32. The thirty-second part of the report  
 33. The thirty-third part of the report  
 34. The thirty-fourth part of the report  
 35. The thirty-fifth part of the report  
 36. The thirty-sixth part of the report  
 37. The thirty-seventh part of the report  
 38. The thirty-eighth part of the report  
 39. The thirty-ninth part of the report  
 40. The fortieth part of the report  
 41. The forty-first part of the report  
 42. The forty-second part of the report  
 43. The forty-third part of the report  
 44. The forty-fourth part of the report  
 45. The forty-fifth part of the report  
 46. The forty-sixth part of the report  
 47. The forty-seventh part of the report  
 48. The forty-eighth part of the report  
 49. The forty-ninth part of the report  
 50. The fiftieth part of the report  
 51. The fifty-first part of the report  
 52. The fifty-second part of the report  
 53. The fifty-third part of the report  
 54. The fifty-fourth part of the report  
 55. The fifty-fifth part of the report  
 56. The fifty-sixth part of the report  
 57. The fifty-seventh part of the report  
 58. The fifty-eighth part of the report  
 59. The fifty-ninth part of the report  
 60. The sixtieth part of the report  
 61. The sixty-first part of the report  
 62. The sixty-second part of the report  
 63. The sixty-third part of the report  
 64. The sixty-fourth part of the report  
 65. The sixty-fifth part of the report  
 66. The sixty-sixth part of the report  
 67. The sixty-seventh part of the report  
 68. The sixty-eighth part of the report  
 69. The sixty-ninth part of the report  
 70. The seventieth part of the report  
 71. The seventy-first part of the report  
 72. The seventy-second part of the report  
 73. The seventy-third part of the report  
 74. The seventy-fourth part of the report  
 75. The seventy-fifth part of the report  
 76. The seventy-sixth part of the report  
 77. The seventy-seventh part of the report  
 78. The seventy-eighth part of the report  
 79. The seventy-ninth part of the report  
 80. The eightieth part of the report  
 81. The eighty-first part of the report  
 82. The eighty-second part of the report  
 83. The eighty-third part of the report  
 84. The eighty-fourth part of the report  
 85. The eighty-fifth part of the report  
 86. The eighty-sixth part of the report  
 87. The eighty-seventh part of the report  
 88. The eighty-eighth part of the report  
 89. The eighty-ninth part of the report  
 90. The ninetieth part of the report  
 91. The ninety-first part of the report  
 92. The ninety-second part of the report  
 93. The ninety-third part of the report  
 94. The ninety-fourth part of the report  
 95. The ninety-fifth part of the report  
 96. The ninety-sixth part of the report  
 97. The ninety-seventh part of the report  
 98. The ninety-eighth part of the report  
 99. The ninety-ninth part of the report  
 100. The hundredth part of the report

The first part of the report is  
 The second part of the report is  
 The third part of the report is  
 The fourth part of the report is  
 The fifth part of the report is  
 The sixth part of the report is  
 The seventh part of the report is  
 The eighth part of the report is  
 The ninth part of the report is  
 The tenth part of the report is  
 The eleventh part of the report is  
 The twelfth part of the report is  
 The thirteenth part of the report is  
 The fourteenth part of the report is  
 The fifteenth part of the report is  
 The sixteenth part of the report is  
 The seventeenth part of the report is  
 The eighteenth part of the report is  
 The nineteenth part of the report is  
 The twentieth part of the report is  
 The twenty-first part of the report is  
 The twenty-second part of the report is  
 The twenty-third part of the report is  
 The twenty-fourth part of the report is  
 The twenty-fifth part of the report is  
 The twenty-sixth part of the report is  
 The twenty-seventh part of the report is  
 The twenty-eighth part of the report is  
 The twenty-ninth part of the report is  
 The thirtieth part of the report is  
 The thirty-first part of the report is  
 The thirty-second part of the report is  
 The thirty-third part of the report is  
 The thirty-fourth part of the report is  
 The thirty-fifth part of the report is  
 The thirty-sixth part of the report is  
 The thirty-seventh part of the report is  
 The thirty-eighth part of the report is  
 The thirty-ninth part of the report is  
 The fortieth part of the report is  
 The forty-first part of the report is  
 The forty-second part of the report is  
 The forty-third part of the report is  
 The forty-fourth part of the report is  
 The forty-fifth part of the report is  
 The forty-sixth part of the report is  
 The forty-seventh part of the report is  
 The forty-eighth part of the report is  
 The forty-ninth part of the report is  
 The fiftieth part of the report is  
 The fifty-first part of the report is  
 The fifty-second part of the report is  
 The fifty-third part of the report is  
 The fifty-fourth part of the report is  
 The fifty-fifth part of the report is  
 The fifty-sixth part of the report is  
 The fifty-seventh part of the report is  
 The fifty-eighth part of the report is  
 The fifty-ninth part of the report is  
 The sixtieth part of the report is  
 The sixty-first part of the report is  
 The sixty-second part of the report is  
 The sixty-third part of the report is  
 The sixty-fourth part of the report is  
 The sixty-fifth part of the report is  
 The sixty-sixth part of the report is  
 The sixty-seventh part of the report is  
 The sixty-eighth part of the report is  
 The sixty-ninth part of the report is  
 The seventieth part of the report is  
 The seventy-first part of the report is  
 The seventy-second part of the report is  
 The seventy-third part of the report is  
 The seventy-fourth part of the report is  
 The seventy-fifth part of the report is  
 The seventy-sixth part of the report is  
 The seventy-seventh part of the report is  
 The seventy-eighth part of the report is  
 The seventy-ninth part of the report is  
 The eightieth part of the report is  
 The eighty-first part of the report is  
 The eighty-second part of the report is  
 The eighty-third part of the report is  
 The eighty-fourth part of the report is  
 The eighty-fifth part of the report is  
 The eighty-sixth part of the report is  
 The eighty-seventh part of the report is  
 The eighty-eighth part of the report is  
 The eighty-ninth part of the report is  
 The ninetieth part of the report is  
 The ninety-first part of the report is  
 The ninety-second part of the report is  
 The ninety-third part of the report is  
 The ninety-fourth part of the report is  
 The ninety-fifth part of the report is  
 The ninety-sixth part of the report is  
 The ninety-seventh part of the report is  
 The ninety-eighth part of the report is  
 The ninety-ninth part of the report is  
 The hundredth part of the report is

11. Cooper, A. D.; Creaser, C. S.; Farrington, W. H. H.; Tarbin, J. A.; Shearer, G. Development of multi-residue methodology for the HPLC determination of veterinary drugs in animal tissues. *Food Additives and Contaminants* 1995, 12, 167-176
12. Galeano Diaz, T.; Lopez Martinez, L.; Martinez Galera, M.; Salinas, F. Rapid determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in formulations, feed and milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography. A*, 1994, 17, 457-475.
13. Anonim, 1999, *Oxytetracycline Residues in Cultured White Shrimp Tissue by HPLC and a Microbial Receptor Assay*,  
<http://www.wws.princeton.edu/cgi-bin/byteserv.prlota/disk3/1979/7905/790503.PDF>, diakses Januari 2006.
14. Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., MacNeil, J.D., 1995, *Chemical Analysis for Antibiotic used in Agriculture*, AOAC International, USA, p 333-400.
15. Laurensen, J. J.; Nouws, J. F. M. Simultaneous determination of nitrofurans derivatives in various animal substrates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatogr.* 1989, 472, 321-326.
16. A. Pena; A. Carmona; A. Barbosa; C. Lino; I. Silveira; B. Castillo. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection, *J. of Pharm. Biomed Analysis*, 1998, 18, 839-845
17. M. Touraki, P. Rigas, P. Pergandas, C. Kastritsis, Determination of oxytetracycline in the live fish feed *Artemia* using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*, 1995, 663, 167-171.
18. I.N. Papadoyannis, V.F. Samanidou, and L.A. Kovatsi, A rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the determination of oxytetracycline in commercial pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 23, 273-280.
19. G. Hamscher, S. Sczesny, H. Höper, and H. Nau, Determination of tetracyclines and tylosin in soil and water samples from agricultural areas in lower Saxony. *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1509-1518.
20. G. Boatto; A. Pau, M. Palomba, L. Arenare, R. Cerri, Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 20, 321-326.

The following is a list of the names of the  
 persons who have been appointed to the  
 various committees of the Board of  
 Education, for the year 1900-1901.  
 The names are given in the order in  
 which they were appointed, and the  
 names of the members of each  
 committee are given in the order in  
 which they were appointed.

The following is a list of the names of the  
 persons who have been appointed to the  
 various committees of the Board of  
 Education, for the year 1900-1901.  
 The names are given in the order in  
 which they were appointed, and the  
 names of the members of each  
 committee are given in the order in  
 which they were appointed.

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100

21. McCracken R.J.; Kennedy, D.G. Determination of the furazolidone metabolites, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatographic-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *J. Chromatogr. B.* **1997**, *691*, 87-94.
22. Draisci, R.; Giannetti, L.; Lucentini, L.; Palleschi, L.; Brambilla, G.; Serpe, L.; Gallo, P. Determination of nitrofurans residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1997**, *777*, 201-211.
23. Leitner, A.; Zöllner P.; Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2001**, *939*, 49-58.
24. A.L.Cinquina; F. Longo; G. Anastasi; L. Giannetti; R. Cozzani, Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle, *Journal of chromatography. A.* **2003**, *987*, 227-233.

Faint, illegible text on the left side of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

Faint, illegible text on the right side of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

