

SKRIPSI

BAGUES LANANG

VALIDASI METODE KLT-DENSITOMETRI UNTUK ANALISIS RESIDU FURAZOLIDON DALAM UDANG



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2004**

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirrabbi'l'aalamiin. Segala puji Allah *subhanahu wa ta'ala* atas rahmat, taufiq dan hidayah-Nya. Hanya atas pertolongan dan kehendak-Nya kami dapat menyelesaikan skripsi berjudul “Validasi Metode KLT-Densitometri untuk Analisis Residu Furazolidon dalam Udang” dengan baik. Pada kesempatan ini kami menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Noor Cholish Zaini selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk menyelesaikan program pendidikan S-1 farmasi.
2. Dr.rer.nat. Mohammad Yuwono, MS dan Dra. Andjar Sardjimah, MS selaku dosen pembimbing yang telah memberikan banyak saran dan bimbingan kepada kami untuk menyelesaikan penelitian ini.
3. Dr. Achmad Syahrani, MS dan Drs. Achmad Toto Poernomo, MSi selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran kepada kami untuk penelitian ini.
4. Drs. Achmad Toto Poernomo, MSi selaku dosen wali kami yang telah memberikan banyak bantuan selama kami belajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
5. Ayah dan ibuku yang telah memberikan banyak hal yang sangat bernilai. Juga kepada adikku yang telah memberikan banyak dukungan. Semoga Allah *subhanahu wa ta'ala* memberikan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya kepada mereka dan memasukkan mereka kedalam surga-Nya.
6. Seluruh dosen, karyawan, dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Kepala dan karyawan Unit Layanan Pengujian dan Laboratorium Multi Purpose I Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
8. Rekan-rekan satu laboratorium dalam penelitian, yaitu Slamet, Andhi, dan Fahrizal atas dukungannya.
9. Sahabat-sahabatku Didik, Arif, Pras, Diana, Nia, Pipit Ermawita, teman-temanku angkatan 1999 dan para penghuni kontrakan *Asy-Syifa'*.
10. Pihak-pihak lainnya yang membantu kami dalam menyelesaikan penelitian ini.

Kepada semua pihak yang telah membantu penelitian kami, semoga Allah *subhanahu wa ta'ala* memberikan banyak pahala dan kebaikan kepada mereka, menunjuki mereka ke jalan yang lurus dan memasukkan mereka kedalam surga-Nya.

Semoga hasil penelitian kami ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu kimia analisis dan dapat berguna bagi pihak-pihak yang terkait. Sebagai penutup kami, kami sangat mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak terhadap hasil penelitian kami ini. Besar harapan kami, di kemudian hari ada peneliti yang meneruskan atau menyempurnakan penelitian ini.

Surabaya, Agustus 2004

Penyusun

RINGKASAN

VALIDASI METODE KLT-DENSITOMETRI UNTUK ANALISIS RESIDU FURAZOLIDON DALAM UDANG

Bagoes Lanang

Penggunaan furazolidon untuk pencegahan infeksi dan pengobatan pada udang dapat meninggalkan residu dalam udang. Furazolidon digunakan oleh peternak di banyak negara. Furazolidon juga digunakan oleh peternak udang di Indonesia, antara lain di Panti Benih Gondol (Bali) dan panti benih lainnya di Jawa Timur. Udang yang mengandung residu furazolidon dapat membahayakan kesehatan konsumen. Oleh karena itu, negara-negara importir udang, antara lain negara-negara Uni Eropa dan Amerika Serikat melakukan pengawasan ketat terhadap produk udang tersebut. Negara-negara importir udang tidak mau menerima produk udang yang mengandung residu antibiotika, termasuk furazolidon.

Beberapa metode telah digunakan dan dikembangkan untuk mendeteksi residu furazolidon dalam udang. Metode itu antara lain KLT-Densitometri, HPLC dan HPLC/MS. Pada penelitian ini digunakan metode KLT-Densitometri karena penelitian mengenai analisis residu furazolidon dalam udang dengan metode KLT-Densitometri belum pernah dilakukan. Teknik kromatografi dengan KLT lebih mudah dilakukan dan biaya lebih murah daripada HPLC. Selain itu, metode ini merupakan metode standar yang banyak digunakan di Indonesia.

Tujuan penelitian ini untuk membantu menyelesaikan masalah yang dihadapi oleh Departemen Kelautan dan Perikanan, eksportir dan importir udang serta pihak-pihak lain yang terkait untuk menganalisis residu furazolidon dalam udang dengan metode yang tervalidasi.

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode KLT-Densitometri untuk mendapatkan metode analisis yang reliabel (dapat dipercaya) dan mendekati kebenaran. Validasi metode tersebut meliputi spesifisitas, linieritas, homogenitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi.

Pengujian spesifisitas menetapkan silika gel GF 254 sebagai fase diam, kloroform-asetonitril (3:1) sebagai fase gerak dan panjang gelombang maksimum furazolidon adalah 360 nm. Pengujian linieritas menghasilkan persamaan garis $Y=27,51X+0,23$ dengan $r=0,9991$ dan $V_{xo}=1,90\%$. Pengujian homogenitas menghasilkan harga $PW=4,6522$. Harga batas deteksi dan batas kuantitasi adalah 1,34 ng dan 4,48 ng.

Ekstraksi furazolidon dalam sampel udang menggunakan pelarut aseton-aquadest (9:1). Harga persen rekovery rata-rata dan presisi adalah 69,68% dan 20,58%. Persyaratan harga persen rekovery untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak yang dipublikasikan oleh US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) sebesar 70%-120%. Sedangkan persyaratan presisi yang dipublikasikan oleh US EPA untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak sebesar 20%. Metode ini dapat digunakan untuk analisis kualitatif residu furazolidon dalam sampel udang basah dengan kadar 0,282 ppm atau lebih besar.

ABSTRACT

Validation of TLC-Densitometric Method to Determine Furazolidone Residue in Shrimps

A simple TLC-Densitometric method has been validated for the determination of furazolidone residue in shrimps. The parameters of validation include linearity, homogeneity, detection limit (LOD), quantitation limit (LOQ), accuracy and precision. The method involves silica gel GF 254 as the stationary phase and chloroform-acetonitrile (3:1 v/v) as the mobile phase. The separated furazolidone spot was detected at λ 360 nm. The respond was found to be linear at the amount of furazolidone between 10.28 and 30.84 ng ($r=0.9991$, $Y=27.51X+0.23$, $V_{xo}=1.90\%$). The result showed that the PW value is 4.6522, detection limit and quantitation limit value are 1.34 and 4.48 ng, respectively; where as the accuracy and precision are 69.68% and 20.58%, respectively.

Keywords : TLC-Densitometric, validation, furazolidone, shrimps

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Validasi Metode Analisis	5
2.1.1 Spesifisitas	5
2.1.2 Linieritas	5
2.1.3 Homogenitas	6
2.1.4 Batas Deteksi (LOD).....	6
2.1.5 Batas Kuantitasi (LOQ)	7
2.1.6 Akurasi	7
2.1.7 Presisi	9
2.2 Penggunaan Antibiotika dalam Peternakan dan Perikanan	9
2.3 Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan Hewani	10
2.3.1 Terjadinya Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan Hewani.....	10
2.3.2 Batas Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan	10
2.3.3 Dampak Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan.....	10
2.4 Tinjauan tentang Furazolidon	11
2.4.1 Sifat Fisika-Kimia Furazolidon.....	11
2.4.2 Farmakologi Furazolidon.....	11

2.4.3 Penggunaan Furazolidon	
dalam Peternakan dan Perikanan.....	12
2.4.4 Identifikasi Furazolidon	12
2.5 Tinjauan tentang Ekstraksi.....	13
2.6 Tinjauan tentang Kromatografi.....	15
2.7 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis.....	16
2.8 Tinjauan tentang Densitometri.....	19
2.8.1 Analisis Kualitatif dengan KLT-Densitometri.....	25
2.8.2 Analisis Kuantitatif dengan KLT-Densitometri	25
2.9 Tinjauan tentang Ekstraksi Furazolidon	25

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual.....	27
3.2 Bagan Kerangka Konseptual.....	28

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Bahan	29
4.2 Alat.....	29
4.3 Validasi Metode Analisis.....	29
4.3.1 Spesifisitas	29
4.3.1.1 Fase Diam	29
4.3.1.2 Pembuatan Larutan Baku Induk.....	30
4.3.1.3 Pemilihan Fase Gerak	30
4.3.1.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	30
4.3.2 Linieritas	30
4.3.2.1 Pembuatan Larutan Baku.....	30
4.3.2.2 Pembuatan Kurva Linieritas	31
4.3.3 Homogenitas	32
4.3.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ).....	32
4.3.5 Akurasi.....	33
4.3.5.1 Pengeringan Udang.....	33
4.3.5.2 Preparasi Sampel.....	33

4.3.5.3 Penentuan Persen Rekoveri	33
4.3.6 Presisi	34
BAB V HASIL PENELITIAN	
5.1 Spesifisitas	36
5.1.1 Hasil Pengamatan Pembuatan Larutan Baku	36
5.1.2 Hasil Pengamatan Pemilihan Fase Gerak	36
5.1.3 Hasil Pengamatan Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	37
5.2 Linieritas	38
5.3 Homogenitas	39
5.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ).....	40
5.5 Akurasi	42
5.5.1 Hasil Pengamatan Pengeringan Udang.....	42
5.5.2 Hasil Pengamatan Persen Rekoveri	42
5.6 Presisi	44
BAB VI PEMBAHASAN	47
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan.	51
7.2 Saran.	51
DAFTAR PUSTAKA.	52

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Ketentuan harga persen rekoverti untuk analisis residu dalam produk hasil Pertanian, makanan dan pakan ternak	8
Tabel II.2 Ketentuan harga koefisien variasi (KV) untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak	9
Tabel IV.1 Penimbangan sampel udang dan penambahan standar furazolidon	35
Tabel V.1 Hasil pengamatan harga Rf beberapa fase gerak	36
Tabel V.2 Hasil pengamatan linieritas furazolidon	38
Tabel V.3 Hasil pengamatan homogenitas furazolidon	39
Tabel V.4 Hasil pengamatan serapan blanko.....	40
Tabel V.5 Hasil pengamatan serapan furazolidon	41
Tabel V.6 Hasil pengamatan pengeringan udang	42
Tabel V.7 Hasil pengamatan persen rekoverti furazolidon.....	42
Tabel V.8 Hasil pengamatan serapan standar furazolidon untuk kurva baku.....	43
Tabel V.9 Hasil pengamatan presisi furazolidon	44
Tabel V.9 Hasil pengamatan kadar furazolidon dalam sampel udang.....	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur kimia furazolidon	11
Gambar 2.2 Diagram optis densitometri transmisi	20
Gambar 2.3 Diagram optis densitometri reflektan.....	21
Gambar 2.4 Diagram optis densitometri reflektan fluoresensi	22
Gambar 5.1 Hasil eluasi beberapa fase gerak	36
Gambar 5.2 Spektrum furazolidon.....	37
Gambar 5.3 Kurva linieritas furazolidon	38
Gambar 5.4 Hasil eluasi pengujian linieritas furazolidon.....	39
Gambar 5.5 Hasil eluasi pengujian homogenitas furazolidon	40
Gambar 5.6 Hasil eluasi penentuan LOD dan LOQ furazolidon.....	41
Gambar 5.7 Hasil eluasi penentuan akurasi dan presisi furazolidon	43
Gambar 5.8 Hasil eluasi pengamatan kadar furazolidon dalam sampel udang .	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Perhitungan linieritas furazolidon	55
Lampiran 2 Perhitungan homogenitas furazolidon	59
Lampiran 3 Perhitungan LOD dan LOQ furazolidon	60
Lampiran 4 Perhitungan persen rekovery furazolidon	62
Lampiran 5 Perhitungan presisi furazolidon	64
Lampiran 6 Tabel harga F	65
Lampiran 7 Hasil <i>scanning</i> linieritas furazolidon	66
Lampiran 8 Hasil <i>scanning</i> homogenitas furazolidon	67
Lampiran 9 Hasil <i>scanning</i> LOD dan LOQ furazolidon	68
Lampiran 10 Hasil <i>scanning</i> akurasi dan presisi furazolidon	69
Lampiran 11 Hasil <i>scanning</i> kadar furazolidon dalam sampel udang	71

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Data tahun 2000 dari Dinas Perikanan Tingkat I Jawa Timur menunjukkan bahwa udang merupakan andalan ekspor utama yang menyumbang 691. 984. 664, 3 USD dari total ekspor perikanan sebesar 988. 836. 273, 7 USD atau sekitar 70%. Produk perikanan, khususnya udang sangat diminati oleh pasar mancanegara, antara lain Jepang, Amerika Serikat dan Uni Eropa.

Dewasa ini penggunaan antibiotika dibidang peternakan dan perikanan sudah demikian luas, digunakan untuk merangsang pertumbuhan hewan-hewan muda, meningkatkan efisiensi makanan dan produktivitas serta untuk tindakan pencegahan dan pengobatan terhadap suatu penyakit. Penggunaan antibiotika pada hewan ternak secara terus-menerus dan tidak tepat ternyata dapat meninggalkan residu didalam jaringan atau produk lain dari peternakan dan perikanan. Residu antibiotika tersebut apabila dikonsumsi oleh manusia dapat mengakibatkan resistensi terhadap antibiotika tersebut (Gibbons, 2002).

Furazolidon, suatu antibiotika nitrofuran digunakan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit pada Udang Harimau (*Black Tiger*, nama latin *Panaeus monodon*) yang disebabkan oleh bakteri dan mikroorganisme lain (Departemen Pertanian Malaysia, 2002). Selain digunakan untuk budidaya air tawar, furazolidon juga digunakan sebagai antibiotika pada unggas (Gibbons, 2002).

Furazolidon digunakan sebagai antibiotika oleh peternak udang di Asia Tenggara dalam jumlah yang sangat besar. Peternak udang di Thailand menggunakan antibiotika dengan jumlah sekitar 10% dari total pakan udang yang digunakan (Moriarty, 1999). Furazolidon juga digunakan oleh peternak udang di Indonesia, antara lain di Panti Benih Gondol (Bali) dan panti benih lainnya di Jawa Timur (Rukyani, dkk., 1997).

Furazolidon memiliki efek karsinogenik (penyebab kanker) dan mutagenik (penyebab mutasi gen) pada manusia jika dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama. Efek ini diduga disebabkan oleh senyawa 2-hidroksietil hidrazin (HEH)

yang merupakan hasil metabolisme dari 3-amino-2-oksazolidinon (AOZ), sebuah struktur samping dari furazolidon (Hoogenboom, dkk., 2002).

Sejak tahun 2000 Komisi Eropa melakukan pengawasan yang lebih ketat terhadap residu antibiotika, antibakteri, hormon, dan peptisida terhadap semua produk peternakan dan perikanan, termasuk semua jenis ikan budidaya, khususnya udang. Negara-negara yang tidak mematuhi ketentuan ini diancam akan dikenakan “*Temporary Suspension*” (penghentian sementara) terhadap ekspor produk perikanan. Inggris dan Belanda mulai Februari 2002 melaporkan pada RASSF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) tentang penemuan senyawa nitrofurant dalam produk peternakan dari Asia Tenggara dan hal ini diuji di *Border Inspection Post* (BIPs). Kadar residu nitrofurant yang sering terdeteksi di Inggris dan Belanda dibawah 1 ppb (*part per billion*) (Rikilt-DLO, 2002). Negara-negara pengimpor udang tidak mau menerima apabila didalam udang ekspor tersebut mengandung residu antibiotika dan antibakteri. Untuk menjamin kesehatan konsumen dan meningkatkan kualitas udang ekspor diperlukan pemantauan yang ketat terhadap residu antibiotika pada udang, khususnya udang beku ekspor.

Uni Eropa melarang penggunaan nitrofurant dalam pakan ternak. Makanan yang mengandung residu nitrofurant (furazolidon, furaltadon dan nitrofurazon) dilarang beredar di Uni Eropa (RSSL, 2002). The Codex Alimentarius Republik Slovakia menetapkan kadar residu maksimum (*Maximum Residue Batass*, disingkat MRLs) furazolidon pada makanan manusia sebesar 0,005 mg/kg (Departemen Kesehatan Republik Slovakia, 2002). Dalam peraturan yang termuat dalam *Public Health (Animals and Birds) Chemical Residue Regulation and Harmful Substances in Food (Amandment) Regulation* tanggal 31 Oktober 2001 tercantum kadar residu maksimum (MRLs) furazolidon dalam daging, hati dan ginjal sapi, babi dan unggas adalah 0 (nol) µg/kg (Hongkong Legislative Council, 2002). FDA (*Food and Drug Administration*) Amerika Serikat membuat ketentuan “tidak ada residu” yang bersifat karsinogenik (penyebab kanker) ditemukan dalam makanan (Gibbons, 2002).

Analisis residu antibiotika furazolidon dalam sampel pakan ternak, makanan manusia, termasuk udang dapat digunakan beberapa metode, antara lain HPLC-Detektor UV (ultraviolet), HPLC-Detektor MS (*Mass Spectra*), HPLC-Detektor

MS/MS (Rikilt-DLO, 2002), KLT-Densitometri, KLT-Spektrofotometri (The National Academy of Sciences, 2000).

Analisis residu furazolidon dalam daging sapi dengan metode HPLC memiliki batas deteksi 1 ppb (Angelini, dkk., 1997). Sedangkan analisis residu furazolidon dalam daging dengan metode HPLC-MS/MS memiliki batas deteksi 0,5 sampai 1 ppb (Nordlander, 2003). Metode analisis furazolidon dengan metode spektrofotometri dan KLT dalam makanan memberikan hasil analisis dan rekovery (perolehan kembali) yang kurang memuaskan pada konsentrasi 0,5 sampai 4 ppb (The National Academy of Sciences, 2000).

Penelitian mengenai analisis residu furazolidon dalam udang dengan metode KLT-Densitometri belum pernah dilakukan. Teknik kromatografi dengan KLT lebih mudah dilakukan dan biaya lebih murah daripada HPLC (Fried dan Sherma, 1994). Metode analisis KLT-Densitometri merupakan metode standar yang banyak digunakan di Indonesia. Laboratorium-laboratorium maupun instansi pemerintah telah dilengkapi instrumen densitometer.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah diatas, maka yang menjadi permasalahan adalah bagaimana hasil validasi metode KLT-Densitometri yang meliputi spesifisitas, linieritas, homogenitas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ), akurasi dan presisi untuk menganalisis residu furazolidon dalam udang.

1.3 Tujuan Penelitian

Mendapatkan metode KLT-Densitometri tervalidasi yang memenuhi kriteria spesifisitas, linieritas, homogenitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi untuk menganalisis residu furazolidon dalam udang.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian analisis residu antibakteri furazolidon pada sampel udang adalah:

1. Membantu menyelesaikan masalah yang dihadapi oleh Departemen Kelautan dan Perikanan, eksportir dan importir udang serta pihak-pihak lain

yang terkait untuk menganalisis residu furazolidon dalam udang dengan metode yang tervalidasi.

2. Berperan aktif dalam perkembangan ilmu pengetahuan, terutama ilmu kimia analisis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis perlu dilakukan untuk mendapatkan suatu metode analisis yang dapat dipercaya dan mendekati kebenaran. Validasi metode analisis menurut USP XXV tahun 2002 meliputi selektivitas, linieritas, batas deteksi (*Batas of Detection*, disingkat LOD) dan batas kuantitasi (*Batas of Quantitation*, disingkat LOQ), akurasi dan presisi.

2.1.1 Spesifisitas

Menurut USP XXV (2002) spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit secara akurat bila analit bersama dengan komponen lain yang ada, misalnya pengotor, produk hasil degradasi dan komponen matriks.

Dalam kasus pengujian, hasil spesifisitas menunjukkan bahwa prosedur tidak dipengaruhi oleh keberadaan pengotor atau eksipien. Dalam prakteknya, ini dapat dilakukan dengan cara melakukan “*spiking*” senyawa obat atau produk bersama dengan pengotor atau eksipien dalam jumlah tertentu dan menunjukkan bahwa hasil pengujian tidak dipengaruhi oleh keberadaan material luar ini (USP XXV, 2002).

Jika standar produk yang tidak murni atau hasil degradasi tidak tersedia, spesifisitas dapat dilakukan dengan cara membandingkan hasil tes sampel yang mengandung pengotor atau produk hasil degradasi dengan prosedur kedua yang telah dikenali dengan baik, misalnya prosedur farmakope yang tervalidasi atau prosedur yang telah tervalidasi lainnya (USP XXV, 2002).

2.1.2 Linieritas

Menurut USP XXV (2002) linieritas adalah kemampuan untuk merespon hasil uji secara langsung atau perhitungan menurut hubungan matematis yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel pada trayek tertentu.

Linieritas dinyatakan dalam istilah variasi sekitar slope dari garis regresi yang dihitung menurut hubungan matematis dari hasil yang diperoleh dari hasil

analisis dengan kadar analit bervariasi. Penentuan linieritas menurut USP XXV (2002) menggunakan minimal 5 macam konsentrasi dimana kelima macam konsentrasi tersebut berkisar antara 80-120% dari kadar analit yang diperkirakan.

Linieritas suatu metode harus diuji untuk membuktikan adanya hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respon detektor. Sebaiknya pengujian linieritas dilakukan pada konsentrasi 25-200% dari konsentrasi analit yang diperkirakan pada sampel (Indrayanto, 1994). Hubungan antara konsentrasi analit dan respon detektor dianggap linier apabila harga koefisien korelasi (r) lebih besar dari 0,99 (APVMA, 2003). Parameter lain yang perlu ditentukan untuk pengujian linieritas antara lain : koefisien variasi fungsi (V_{xo}), tes Mendel, harga X_p , plot dari respon dengan konsentrasi, tes residual, tes ANOVA dan sebagainya (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Jika menggunakan parameter V_{xo} , maka harga V_{xo} sebaiknya tidak lebih dari 2% (Indrayanto, 1994).

2.1.3 Homogenitas

Homogenitas dari kurva linieritas harus dibuktikan dengan melakukan perhitungan harga PW atau lebih dikenal dengan harga F hitung. Harga PW harus lebih kecil dari harga F tabel. Jika harga PW lebih besar dari Harga F tabel berarti kurva kalibrasi tidak homogen dan percobaan harus diulang. Harga PW dihitung dengan rumus :

$$PW = (S_N^2 / S_I^2)$$

dimana:

S_N : Standar deviasi (SD) konsentrasi terkecil dari kurva linieritas

S_I : Standar deviasi (SD) konsentrasi terbesar dari kurva linieritas

(Indrayanto, 1994).

2.1.4 Batas Deteksi (LOD)

Menurut USP XXV (2002) batas deteksi adalah parameter tes batas yang merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi, tetapi tidak dapat untuk kuantitasi pada kondisi eksperimental. Batas deteksi biasanya dinyatakan sebagai konsentrasi analit (misalnya : % dan ppb) dalam sampel.

Pada prosedur analisis instrumental yang melibatkan derau (*noise*) latar belakang (*background*), batas deteksi ditentukan dengan membandingkan konsentrasi analit tertentu terhadap sampel blanko dan menetapkan level minimum dimana analit terdeteksi reliabel (dapat dipercaya). Kadar analit dinyatakan sebagai respon (sinyal), sedangkan sampel blanko dinyatakan dengan derau. Perbandingan respon dengan derau untuk batas deteksi 2:1 atau 3:1 dapat diterima. Pendekatan lainnya tergantung penentuan slope dari kurva kalibrasi dan standar deviasi dari respon. Apapun metode yang digunakan, harus dilakukan validasi lanjutan terhadap batas deteksi sampel yang diduga mendekati atau dipersiapkan pada batas deteksinya (USP XXV, 2002).

2.1.5 Batas Kuantitasi (LOQ)

Menurut USP XXV (2002) batas kuantitasi adalah parameter kuantitasi dimana jumlah analit terendah dalam matriks sampel dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi eksperimental. Batas kuantitasi dinyatakan sebagai konsentrasi analit (misalnya : % dan ppb) dalam sampel.

Pada analisis instrumental, penentuan batas kuantitasi dengan membandingkan pengukuran respon sinyal dari sampel dengan konsentrasi analit yang rendah dengan sinyal sampel blanko, dimana konsentrasi minimum dari analit dapat terkuantitasi secara reliabel. Perbandingan respon dengan derau untuk batas kuantitasi 10:1 dapat diterima. Pendekatan lainnya tergantung penentuan slope dari kurva kalibrasi dan standar deviasi dari respon. Apapun metode yang digunakan, harus dilakukan validasi lanjutan terhadap batas kuantitasi sampel yang diduga mendekati atau dipersiapkan pada batas kuantitasnya (USP XXV, 2002).

2.1.6 Akurasi

Menurut USP XXV (2002) akurasi adalah kedekatan hasil yang diperoleh suatu metode dengan kadar yang sebenarnya. Akurasi sering dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% rekovery), melalui pengujian sejumlah analit

tambahan yang diketahui dalam sampel. Akurasi juga dinyatakan sebagai perbedaan antara rata-rata dan harga sebenarnya yang dapat diterima dengan interval kepercayaan.

Persen rekoveryi dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksipien obat dan cairan biologis), kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80-120% dari konsentrasi analit yang diperkirakan), selanjutnya dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo, maka dipakai metode adisi dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang akan diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen rekoveryi ditentukan dengan menentukan berapa persen dari analit yang ditambahkan dapat ditemukan (Indrayanto, 1994).

Cara lain dari metode adisi adalah menambahkan beberapa konsentrasi analit (minimal 3) pada sampel. Kemudian masing-masing sampel dengan penambahan analit dan sampel tanpa penambahan analit dianalisis. Setelah dibuat kurva regresi linier antara respon detektor dan jumlah analit yang ditambahkan, maka konsentrasi analit pada sampel dapat ditentukan dengan intersep pada sumbu X (Indrayanto, 1994).

Readnour pada tahun 2003 mengemukakan persyaratan akurasi yang dinyatakan dengan persen rekoveryi suatu metode untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak yang dipublikasikan oleh US FDA (*United States Food and Drug Administration*), US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) dan EU CVMP (*European Union Committee for Veterinary Medicinal Products*). Persyaratan tersebut dapat dilihat pada tabel II.1

Tabel II.1 Ketentuan harga persen rekoveryi untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak (Readnour, 2003)

US FDA {(nilai(kadar analit))}	US EPA	EU CVMP {(nilai(kadar analit))}
60-110% (<0,1 ppm)	70-120%	50-120% (<1 ppb)
80-110% (≥0,1 ppm)		70-110% (≥1 ppb)

2.1.7 Presisi

Menurut USP XXV presisi adalah suatu ukuran derajat keterulangan diantara hasil uji individual jika prosedur diterapkan secara berulang terhadap pengambilan sampel (*sampling*) yang dilakukan berulang kali dari sampel homogen. Parameter presisi biasanya dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) atau koefisien variasi (KV) dari beberapa seri pengukuran (USP XXV, 2002).

Readnour pada tahun 2003 mengemukakan persyaratan presisi suatu metode yang dinyatakan dengan harga KV untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak yang dipublikasikan oleh US FDA (*United States Food and Drug Administration*), US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) dan EU CVMP (*European Union Committee for Veterinary Medicinal Products*). Persyaratan tersebut dapat dilihat pada tabel II.2.

Tabel II.2 Ketentuan harga koefisien variasi (KV) metode untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak (Readnour, 2003)

US FDA {(nilai(kadar analit))}	US EPA	EU CVMP {(nilai(kadar analit))}
20% (<0,1 ppm)	20%	35% (<1 ppb)
10% (≥0,1 ppm)		30% (>1 ppb dan ≤10 ppb)
		20% (>10 ppb dan ≤0,1 ppm)
		15% (≥0,1 ppm)

2.2 Penggunaan Antibiotika dalam Peternakan dan Perikanan

Antibiotika digunakan dalam peternakan dan perikanan untuk merangsang pertumbuhan hewan-hewan muda, meningkatkan efisiensi makanan dan produktivitas serta pencegahan dan pengobatan terhadap suatu penyakit. Antibiotika digunakan pada beberapa produk peternakan dan perikanan, seperti udang, ikan, itik, ayam dan hewan-hewan ternak lainnya (Gibbons, 2002).

Beberapa antibiotika yang banyak digunakan pada peternakan di berbagai negara antara lain : klortetrasiklin, eritromisin, oksitetrasiklin, oleandomisin, penisilin, spiramisin, streptomisin, polimiksin, neomisin, novobiosin, basitrasin, nitrofurantoin, trimethoprim dan florokuinolon (Moriarty, 1999).

2.3 Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan Hewani

2.3.1 Terjadinya Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan Hewani

Residu antibiotika dalam bahan makanan asal hewan (hewani) dapat timbul karena penggunaan antibiotika dalam makanan ternak untuk memungkinkan pertumbuhan yang lebih cepat dan meningkatkan efisiensi pakan ternak, serta penggunaan antibiotika dalam pakan ternak untuk pencegahan terhadap infeksi suatu penyakit pada sekelompok hewan dan penggunaan antibiotika oleh dokter hewan untuk mengobati hewan yang sakit. Faktor-faktor tersebut dapat menyebabkan adanya residu dalam jaringan pada hewan, yang akhirnya dapat sampai kepada konsumen (Gibbons, 2002).

2.3.2 Batas Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan

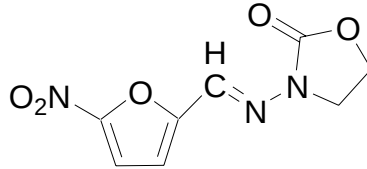
Residu antibiotika dalam bahan makanan pada umumnya hanya ada dalam jumlah yang sangat kecil. Menurut persyaratan sebaiknya “tidak ada residu antibiotika” dalam bahan makanan. Tetapi adanya residu dapat tidak terdeteksi karena tergantung pada kepekaan metode yang digunakan. Oleh karena setiap jumlah residu yang dapat dideteksi seharusnya dilaporkan atau bila tidak terdeteksi harus disebutkan kepekaan metode yang digunakan (Gibbons, 2002).

2.3.3 Dampak Residu Antibiotika dalam Bahan Makanan

Residu antibiotika dalam bahan makanan dapat menyebabkan peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotika tersebut jika dikonsumsi. Bakteri dapat menyesuaikan diri dan tumbuh dengan adanya antibiotika yang digunakan sebagai obat. Pada saat antibiotika diberikan sebagai obat, bakteri yang telah resisten terhadap antibiotika tersebut justru merupakan tempat yang cocok untuk bertahan hidup dan berkembang dengan cepat. Beberapa residu antibiotika, misalnya golongan nitrofurantoin (furazolidon, furaltadon dan nitrofurazon) dapat memicu terjadinya kanker (karsinogenik) bagi konsumen (Gibbons, 2002).

2.4 Tinjauan tentang Furazolidon

2.4.1 Sifat Fisika-Kimia Furazolidon



Gambar 2.1 Struktur kimia furazolidon

Rumus molekul : $C_8H_7N_3O_5$, berat molekul : 225,16. Furazolidon berbentuk kristal warna kuning, tidak berbau, memiliki titik lebur $256-257^\circ\text{C}$. Kristal furazolidon berubah menjadi gelap karena cahaya terang dan terurai karena basa. Kelarutan furazolidon dalam air (pH 6) sekitar 40 mg/l (Budavari, 2001).

Furazolidon memiliki beberapa nama kimia, yaitu 3-[(5-nitro-2-furanil) metilen amino]-2 -oksazolidinon; 3-(5-nitrofurfurildeneamino)-2-oksazolidinon; N-(5-nitro-2-furfuriliden)-3-amino-2-oksazolidinon. Beberapa nama dagang yaitu NF180, Furovag, Furoxane, Furoxone, Giarlam, Giardil, Medaron, Neftin, Nicolen, Nifulidone, Nifuran, Ortazol, Roptazol, Tikofuran dan Topazone. Furazolidon diproduksi secara sintesis dari furfural, hidroksietilhidrazin dan dietil karbonat (Parfitt, 1999; The National Academy of Sciences, 2000 dan Budavari, 2001).

2.4.2 Farmakologi Furazolidon

Furazolidon digunakan untuk pengobatan diare karena bakteri dan protozoa, enteritis yang disebabkan oleh organisme, kolera dan *bacteremic salmonellosis*. Furazolidon efektif untuk pengobatan demam tifoid pada orang dewasa dan giardiasis pada anak-anak. Furazolidon digunakan secara oral dalam bentuk tablet dan suspensi (Parfitt, 1999 dan Olin, 2001).

Efek samping furazolidon antara lain : sakit kepala, hemolisis intravaskuler, hipotensi, emesis, kulit gatal, reaksi pulmoner akut, mual dan muntah. Pemakaian furazolidon dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan kanker dan mutagenasi (Parfitt, 1999; Olin, 2001 dan Hoogenboom, dkk., 2002).

2.4.3 Penggunaan Furazolidon dalam Peternakan dan Perikanan

Furazolidon digunakan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit pada Udang Harimau (*Black Tiger*, nama latin *Panaeus monodon*) yang disebabkan oleh bakteri dan mikroorganisme lain (Departemen Pertanian Malaysia, 2002). Selain digunakan untuk budidaya ikan air tawar, furazolidon juga digunakan untuk pengobatan penyakit salmonellosis pada unggas (Gibbons, 2002). Furazolidon banyak digunakan dalam perikanan sebagai antibakteri *Pseudomonas sp.* dan *Aeromonas sp.* yang menyerang ikan air tawar. Pengobatan untuk ikan air tawar dilakukan dengan cara merendam ikan dalam larutan nitrofurantoin 5-10 ppm selama 12-24 jam. Furazolidon telah digunakan secara luas dan diproduksi dalam skala besar, terutama oleh negara-negara di Asia Tenggara (Departemen Pertanian Malaysia, 2002).

2.4.4 Identifikasi Furazolidon

Identifikasi furazolidon dapat dilakukan dengan reaksi warna dimetilformamida dan etilendiamin. Tes warna dimetilformamida dilakukan dengan cara : serbuk sampel ditetesi dimetilformamida sebanyak 9 tetes dan 1 tetes larutan kalium hidroksida (KOH) beralkohol. Reaksi positif furazolidon menghasilkan warna biru intensif (Horwits, 2000 dan Moffats, 1986).

Sedangkan tes warna etilendiamin dilakukan dengan cara : serbuk sampel ditaburkan diatas kertas saring yang telah dibasahi 2-4 ml etilendiamin, kemudian diamati dibawah mikroskop stereoskopi dengan perbesaran 10 kali. Warna merah tua menunjukkan adanya furazolidon. Daging merah yang biasa dikonsumsi manusia juga memberikan reaksi warna merah tua pada tes ini (Horwits, 2000).

Identifikasi noda furazolidon pada pelat kromatografi lapis tipis (KLT) silika gel GF 254 dilakukan dengan cara menyemprot pelat KLT dengan pereaksi 1,2 – diaminoetan atau pereaksi Dragendorff. Warna ungu pada pelat KLT yang disemprot pereaksi Dragendorff menunjukkan adanya furazolidon (The National Academy of Science, 2000).

2.5 Tinjauan tentang Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan atau penarikan suatu substansi dari suatu campuran (Burlage, dkk., 1963). Ekstraksi dalam istilah farmasi adalah pemisahan senyawa obat aktif yang terdapat dalam jaringan tanaman atau hewan dari komponen yang tidak aktif atau “inert” menggunakan pelarut dan prosedur tertentu (Gennaro, 1995).

Prinsip dasar proses ekstraksi cair-cair dinyatakan berdasarkan Hukum Distribusi atau Partisi Nerst, dimana keadaan suatu sistem yang terdiri dari dua cairan yang tidak saling bercampur bila ditambahkan zat yang dapat larut dalam keduanya, maka zat tersebut akan terdistribusi dalam kedua sistem dengan perbandingan yang tetap pada suhu tertentu. Hukum distribusi banyak digunakan dalam proses ekstraksi, analisis dan penentuan tetapan kesetimbangan (Dunn, 1986).

Dengan rumus $C_1/C_2=K_d$, dimana C_1 adalah konsentrasi zat pelarut dalam pelarut pertama, C_2 adalah konsentrasi zat dalam pelarut kedua (pelarut pengestraksi) yang tidak campur dengan pelarut pertama dan K_d adalah koefisien distribusi atau partisi, maka K_d didapat dengan membandingkan konsentrasi zat dalam pelarut pertama dengan pelarut kedua pada suhu yang sama (Martin, 1993). Harga K_d berubah sedikit dengan naiknya konsentrasi. Harga K_d juga berubah dengan perubahan temperatur. Harga K_d tergantung jenis pelarut dan zat terlarutnya (Sukardjo, 1997).

Hasil ekstraksi yang sempurna selain dipengaruhi oleh koefisien distribusi, juga dipengaruhi oleh volume cairan dan jumlah pengulangan ekstraksi (James, 1986). Hal ini digambarkan sebagai berikut :

Jika : W = Berat zat yang dilarutkan (gram)

V_1 = Volume pelarut pertama atau disebut fase pertama (ml)

V_2 = Volume pelarut kedua (pelarut pengestraksi) yang tidak saling campur dengan fase pertama atau disebut fase kedua setelah ekstraksi pertama (ml)

W_1 = Berat zat yang tersisa dalam fase pertama yang tidak terekstraksi setelah ekstraksi pertama (gram)

W_2 = Berat zat yang tidak terekstraksi yang tersisa pada fase pertama setelah ekstraksi kedua (gram)

Konsentrasi zat terlarut dalam fase pertama :

$$C_1 = \frac{W_1 \text{ (gram)}}{V_1 \text{ (ml)}}$$

Konsentrasi zat dalam fase kedua :

$$C_2 = \frac{W - W_1 \text{ (gram)}}{V_2 \text{ (ml)}}$$

Koefisien partisi dapat ditulis sebagai berikut :

$$K_d = \frac{C_1}{C_2} = \frac{W_1/V_1}{(W - W_1)/V_2}$$

$$\text{atau } W_1 = W \left(\frac{K_d \cdot V_1}{K_d \cdot V_1 + V_2} \right)$$

$$W_2 = W_1 \left(\frac{K_d \cdot V_1}{K_d \cdot V_1 + V_2} \right)$$

Untuk n kali ekstraksi dapat dinyatakan sebagai berikut :

$$W_n = W \left(\frac{K_d \cdot V_1}{K_d \cdot V_1 + V_2} \right)^n$$

Dimana W_n adalah berat sisa zat dalam fase pertama setelah n kali ekstraksi. Persamaan ini memperlihatkan bahwa ekstraksi sempurna bila V_2 bernilai kecil dan n bernilai besar. Jadi, hasil ekstraksi yang baik diperoleh apabila dilakukan ekstraksi dengan sejumlah pelarut pengestraksi yang sedikit, tetapi dilakukan

berulang kali daripada dilakukan sekaligus dengan jumlah pelarut pengestraksi yang banyak, keduanya dengan jumlah pelarut pengestraksi yang sama (Martin, 1993).

Beberapa teknik ekstraksi adalah ultrasonikasi, hidrodestilasi, kromatografi cair, ekstraksi dengan solven (pelarut) secara berulang dan lain-lain. Sedangkan metode dasar ekstraksi adalah maserasi, perkolasi, digesti, infusi dan dekoksi (Gennaro, 1995). Faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi solut (padatan) dengan solven (pelarut) adalah kelarutan solut dalam solven dan beberapa kesetimbangan kimia dimana solut dapat larut dalam solven lainnya (Anderson, 1987).

2.6 Tinjauan tentang Kromatografi

Kromatografi ditemukan dan dinamai oleh seorang ahli botani dari Rusia bernama Mikhail Tsweet pada tahun 1906 (Hamilton, R. dan Hamilton, S., 1987). Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasarkan pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam dibawah pengaruh pergerakan fase yang bergerak (fase gerak atau fase mobil) (Mulya, 1996). Fase gerak kromatografi dapat berupa cairan, gas atau fase superkritis dan fase diamnya dapat berupa kolom atau sebuah permukaan padat (Kellner, 1998).

Komponen yang terikat lemah pada fase diam akan bergerak dengan cepat. Perbedaan mobilitas ini menyebabkan komponen sampel terpisah menjadi pita-pita atau zona-zona tertentu yang kemudian dapat dianalisis secara kualitatif maupun kuantitatif (Skoog, 1998). Asas terjadinya pemisahan pada kromatografi adalah adsorpsi, partisi, filtrasi dan suhu kritis. Sedangkan dasar kromatografi adalah mengubah sistem distribusi keseimbangan statis menjadi sistem distribusi keseimbangan dinamis partikel terlarut dalam sistem distribusi keseimbangan pada fase diam dan fase gerak (Mulya dan Suharman, 1995).

Pada umumnya, semua teknik pemisahan secara kromatografi dapat digunakan untuk keperluan analisis, sedangkan untuk keperluan preparatif atau produksi lebih terbatas pada kromatografi kolom, lapis tipis atau filtrasi gel (Mulya, 1996). Kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis (KLT) dan

kromatografi kolom dapat dilakukan dalam laboratorium apotek dan sangat sesuai untuk identifikasi dan pemeriksaan kemurnian senyawa obat, campuran senyawa obat, sediaan dan zat yang dikandung simplisia. Selain itu, penentuan kadar yang diawali dengan pemisahan secara kromatografi seringkali sangat mempermudah, memperbaiki atau secara keseluruhan memungkinkan untuk dilakukan (Roth dan Blasche, 1994).

Sampai saat ini setelah mengalami perkembangan yang pesat, ternyata metode kromatografi merupakan metode yang rutin digunakan di laboratorium-laboratorium analisis. Hal ini karena keuntungan proses pemisahan secara kromatografi, antara lain : terjadi kontak yang adsorpsi yang berulang kali dan partisi komponen yang dipisahkan, dapat dilakukan dengan mudah, jangkauan analisis kualitatif dan kuantitatif yang luas dari rentang kadar yang sangat tinggi sampai kadar yang sangat rendah, pengoperasiannya mudah dan cepat serta biaya yang relatif murah (Mulya, 1996)

2.7 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu jenis kromatografi cair, dimana sampel ditotolkan berupa titik (*spot*) atau garis pada lapisan tipis yang menempel pada sebuah pelat gelas, plastik atau logam (Fried dan Sherma, 1994). Secara singkat, KLT merupakan metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam dibawah gerakan pelarut pengembang (fase gerak) tunggal atau campur (Mulya dan Suharman, 1995). Fase gerak merambat (migrasi) pada fase diam karena gaya kapilaritas, terkadang dibantu oleh gaya gravitasi dan tekanan. Pada pemisahan komponen dengan KLT, tiap komponen mempunyai waktu migrasi total yang sama tetapi berbeda dalam jarak migrasi yang ditempuh (Fried dan Sherma, 1994). KLT menandai puncak perkembangan kromatografi adsorpsi yang dicetuskan kali pertama oleh Izamailov dan Shraiber pada tahun 1938 (Mulya dan Suharman, 1995).

Fase gerak pada KLT dapat menggunakan pelarut tunggal maupun campuran beberapa pelarut organik atau anorganik. Pemilihan fase gerak sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang akan dipisahkan. Banyak fase diam (lapisan tipis penyerap) yang digunakan, antara lain : silika gel,

selulosa, alumina, poliamida, penukar ion dan silika gel yang terikat secara kimia (Fried dan Sherma, 1994). Aktivitas dari sebuah fase diam ditentukan oleh area permukaannya, sifat kimia dan susunan geometris atom-atom penyusun permukaan fase diam tersebut (Hamilton, R. dan Hamilton, S., 1987). Variasi yang luas dari fase mobil (fase gerak) dan fase diam memberikan banyak pilihan untuk menentukan sebuah sistem KLT yang optimal untuk pemisahan campuran berbagai komponen zat (Fried dan Sherma, 1994).

Kromatografi secara umum, termasuk KLT dapat digunakan untuk pemisahan, isolasi, identifikasi, analisis kualitatif dan kuantitatif komponen-komponen zat dalam suatu campuran (Fried dan Sherma, 1994). Senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap serta terlalu labil untuk kromatografi cair dapat dianalisis dengan KLT, selain itu dapat digunakan untuk memeriksa adanya zat pengotor dalam pelarut (Khopkar, 1990).

Analisis kualitatif suatu analit zat dilakukan dengan cara membandingkan noda kromatogram analit tersebut dengan noda zat standar atau pembanding (*reference standard*) yang dikenal sebagai faktor retensi relatif (R_x).

$$R_x = \frac{\text{jarak migrasi analit}}{\text{jarak migrasi zat standar}}$$

Juga dikenal istilah *reterdation factor* (R_f) untuk setiap noda kromatogram yang didefinisikan dengan :

$$R_f = \frac{\text{jarak migrasi komponen}}{\text{jarak migrasi fase mobil}}$$

Harga R_f dan R_x tidak terlalu penting dalam analisis dengan KLT dibandingkan dengan kromatografi kertas. Hal ini disebabkan daya adsorpsi keaktifan fase diam berbeda karena pelapisan fase diam dibuat dengan berbagai macam cara. Oleh karena itu, penentuan kualitatif dengan zat standar harus dilakukan bersamaan dengan sampel yang dianalisis pada pelat yang sama (Mulya, 1996). Walaupun harga R_f dan R_x tidak menentukan secara mutlak dalam analisis kualitatif, tetapi

harga R_x jauh lebih reproduibel dibanding harga R_f absolut (Fried dan Sherma, 1994).

Faktor-faktor yang paling menentukan harga R_f adalah ketebalan fase diam, kadar air fase gerak dan fase diam, suhu, derajat kejenuhan bejana kromatografi oleh pelarut pengembang (fase gerak) dan ukuran sampel. Kontrol secara sempurna dari variabel-variabel diatas biasanya tidak dilakukan (Skoog, 1998).

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah visualisasi dengan cara fisika atau kimia. Visualisasi secara kimia dilakukan dengan cara mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoresensi yang spesifik. Sedangkan visualisasi secara fisika dilakukan dengan cara melihat noda kromatogram yang mengadsorbsi radiasi ultraviolet atau berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm atau 365 nm. Pada adsorben yang berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet karena telah dicampur dengan zat kimia yang berfluoresensi maka noda akan tampak sebagai pemadaman fluoresensi (*fluorescence quenching*) (Mulya dan Suharman, 1995).

Selain harga R_x dan R_f , analisis kualitatif suatu zat dapat dilakukan dengan pengerokan noda kromatogram kemudian dilarutkan dalam pelarut yang sesuai untuk dipisahkan dari fase diamnya. Selanjutnya identifikasi zat dapat dilakukan dengan spektrofotometri massa (*Mass Spectrophotometry*, disingkat MS), spektrometri magnetik inti dan spektrofotometri –IR (*Infra Red*). Selain itu, analisis kualitatif dapat dilakukan dengan metode densitometri (Fried dan Sherma, 1994).

Untuk analisis kuantitatif dengan kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan cara penentuan tidak langsung dari noda kromatogram dan penentuan langsung dari noda kromatogram. Penentuan tidak langsung dari noda kromatogram dilakukan dengan cara mengerok noda yang teramati, kemudian diekstraksi dengan pelarut yang sesuai. Hasil ekstraksi yang diperoleh dapat diukur dengan metode tertentu, misalnya spektrofotometri. Penentuan langsung dari noda kromatogram (cara “*in situ*”) dilakukan dengan cara membandingkan area noda sampel dengan area noda senyawa standar pada pelat KLT dengan menggunakan metode spektroskopi yang sering disebut densitometri. Cara ini

lebih tepat, praktis dan mudah dilakukan daripada cara penentuan tidak langsung (Fried dan Sherma, 1994).

KLT memiliki peran penting dalam industri obat untuk uji kemurnian produk dan banyak digunakan di laboratorium klinis (Skoog, 1998). Pemisahan yang bermanfaat dari *plasticiser*, antioksidan, tinta dan formulasi zat pewarna dapat ditentukan dengan KLT. Pemakaiannya juga meluas dalam pemisahan senyawa anorganik (Khopkar, 1990).

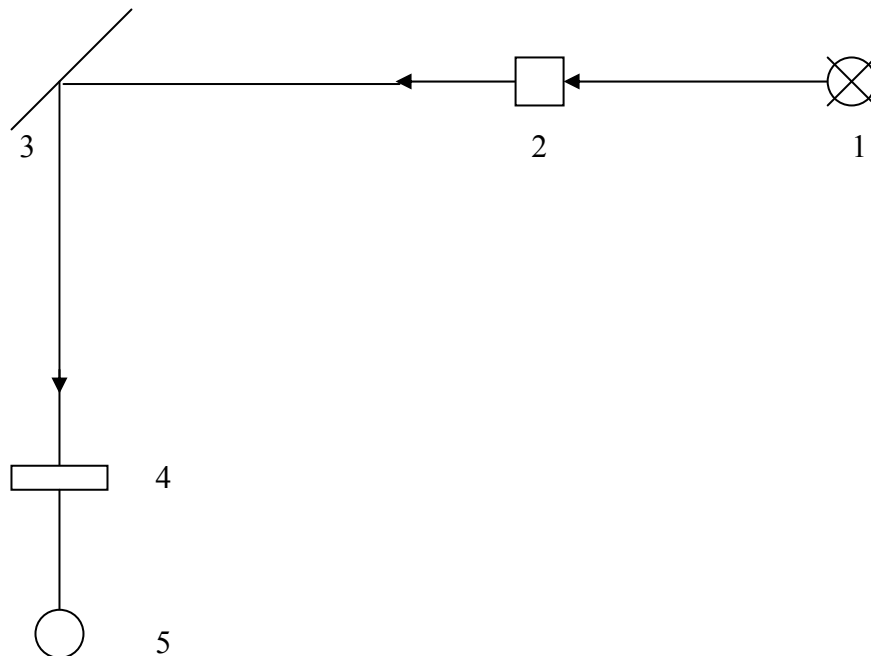
2.8 Tinjauan tentang Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) pendar fluor atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. (Mulya dan Suharman, 1995).

Pemakaian *Thin-Layer Chromato Scanner* yang lebih populer dengan nama densitometer memberikan harapan yang besar untuk analisis kuantitatif komponen-komponen yang kadarnya sangat kecil dalam suatu campuran. Dalam hal ini perlu dilakukan pemisahan komponen-komponen tersebut terlebih dahulu dengan menggunakan KLT (Mulya, 1983).

Pengukuran dengan densitometer secara langsung dari pelat KLT (secara “*in situ*”) dilakukan dengan sistem optik reflektansi, transmisi, reflektansi dan transmisi secara simultan pemadaman fluoresensi (*fluorescence quenching*) (Poole, C.F. dan Poole, S.K., 1994). Berikut ini gambar dari sistem optis densitometer (Mulya, 1983):

1. Berdasarkan perbandingan transmisi sinar tampak yang melewati noda bahan dengan noda pembanding pada kromatogram.

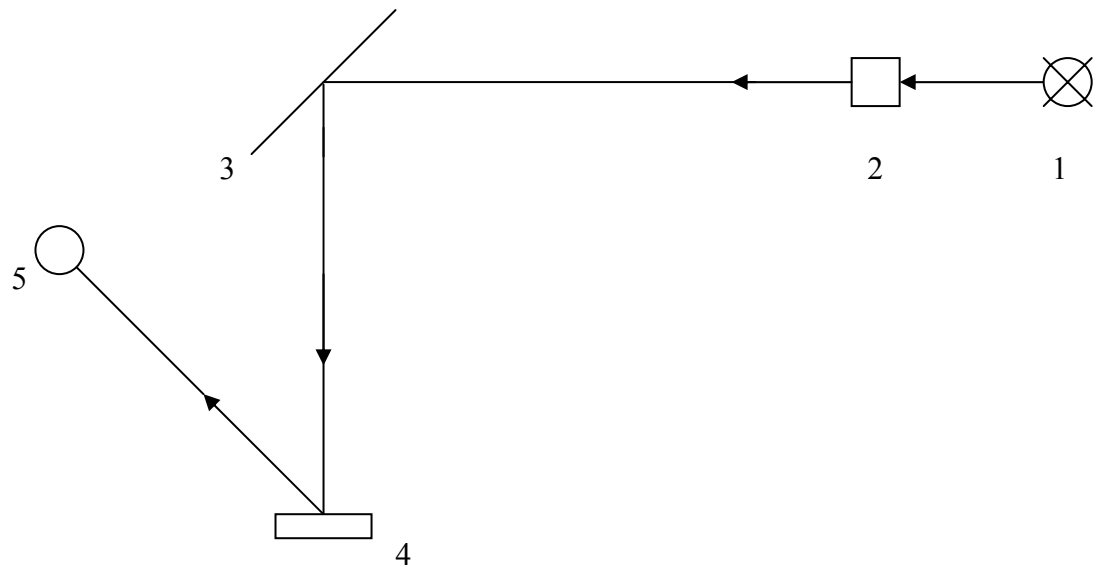


Gambar 2.2 Diagram optis densitometri transmisi.

Keterangan gambar :

1. Sumber cahaya
2. Monokromator
3. Cermin
4. Lapisan tipis
5. Detektor

2. Berdasarkan perbandingan absorpsi sinar ultraviolet atau sinar tampak yang dipantulkan oleh noda bahan dengan noda pembanding pada kromatogram.

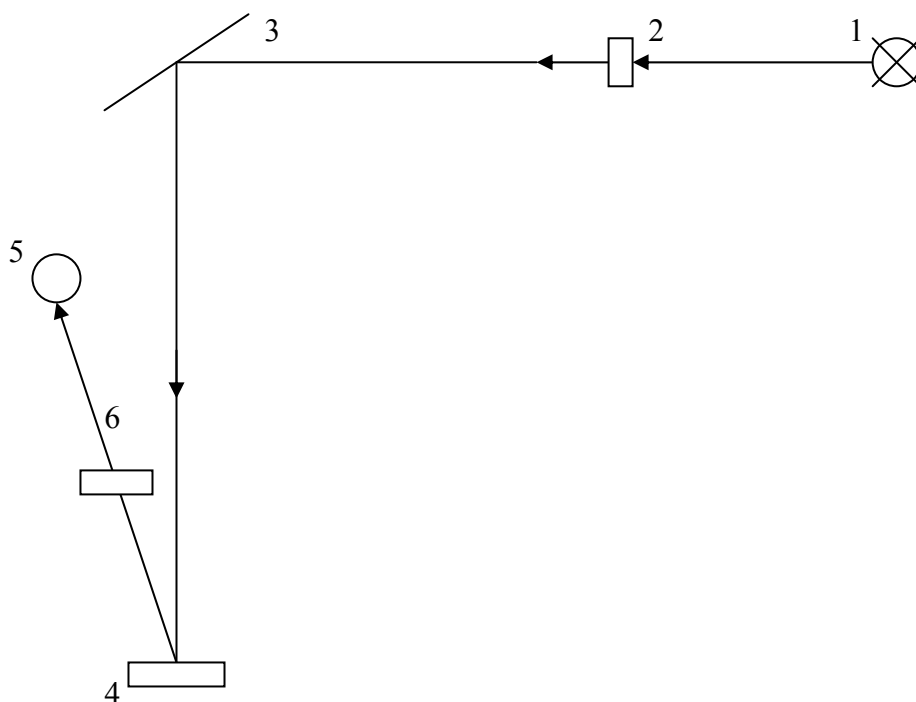


Gambar 2.3 Diagram optis densitometri reflektan

Keterangan gambar :

1. Sumber cahaya
2. Monokromator
3. Cermin
4. Lapisan tipis
5. Detektor

3. Berdasarkan perbandingan absorpsi fluoresensi yang dipantulkan oleh noda bahan dengan noda pembanding pada kromatogram.



Gambar 2.4 Diagram optis densitometri reflektan fluoresensi

Keterangan gambar:

1. Sumber cahaya
2. Monokromator
3. Cermin
4. Lapisan tipis
5. Detektor
6. Filter optis

Densitometer dioperasikan dengan sistem optis transmisi dan reflektan. Komponen-komponen yang berwarna atau komponen-komponen tidak berwarna yang tidak menyerap sinar ultraviolet (u.v) dapat dianalisis dengan penentuan

absorpsi pada panjang gelombang sinar tampak (*visible*) menggunakan sistem optis reflektan dan transmisi. Komponen-komponen tidak berwarna yang menyerap sinar ultraviolet dapat dianalisis dengan mengukur absorbansi sinar ultraviolet yang terjadi menggunakan sistem reflektan. Jika sorben (penyerap) mengandung fosfor, maka senyawa tidak berwarna yang menyerap pada daerah sinar ultraviolet dapat dianalisis menggunakan pengukuran dengan sistem optis pemadaman fluoresensi. Teknik ini dapat diselesaikan dengan menggunakan sistem optis transmisi dan reflektansi. Sistem optis fluoresensi dapat juga digunakan untuk menganalisis komponen dalam jumlah kecil yang berfluoresensi atau telah dibuat berfluoresensi (Touchstone dan Dobbins, 1983).

Lampu yang berbeda harus digunakan sebagai sumber cahaya yang meliputi semua daerah sinar ultraviolet sampai sinar tampak, yaitu pada panjang gelombang 200 sampai 800 nm. Lampu halogen dan tungsten digunakan pada daerah sinar tampak dan lampu deuterium digunakan pada daerah sinar ultraviolet. Lampu merkuri dan xenon dengan densitas tinggi digunakan untuk pengukuran optis secara fluoresensi. Pemilihan panjang gelombang untuk analisis menggunakan monokromator dan filter. Fotomultiplier dan fotodioda pada umumnya digunakan sebagai pengukur signal (detektor) (Poole, C.F. dan Poole, S.K., 1994).

Pada prinsipnya, analisis kuantitatif secara densitometri hampir sama dengan spektrofotometri. Perbedaannya, pada densitometri hubungan antara absorpsi dan konsentrasi bukan merupakan garis linier. Hal ini disebabkan oleh adanya penghamburan dari absorben pada lempeng KLT. Dalam hal ini hubungan antara absorpsi dan konsentrasi pada densitometri cenderung mengikuti penyimpangan negatif dari hukum Lambert-Beer pada pengukuran absorpsi dan konsentrasi dengan metode spektrofotometri untuk kadar yang lebih besar (Mulya, 1983).

Pada hukum Kubelka-Munk, hubungan antara absorpsi dan konsentrasi tidak lagi merupakan garis lengkung, tetapi merupakan garis linier dengan pengaruh mikrokomputer (Mulya, 1983). Hubungan antara kerapatan optik dengan serapan dinyatakan oleh Kubelka dan Munk sebagai persamaan matematik (Mulya dan Suharman, 1995) :

$$+ \frac{dj}{dx} = - (S-K)j + S.i$$

$$- \frac{di}{dx} = + (S-K)i + S.j$$

Keterangan :

- i : intensitas cahaya dengan arah tegak lurus menuju permukaan lapis tipis
- j : intensitas cahaya dengan arah tegak lurus meninggalkan permukaan lapis tipis
- S : faktor penghamburan cahaya tiap satu satuan tebal lapisan tipis
- K : faktor penyerapan cahaya tiap satu satuan tebal lapisan tipis
- x : tebal lapisan tipis pelat KLT

Terdapat tiga jenis densitometer yang diproduksi dan beredar dipasaran, yaitu densitometer sistem berkas tunggal dan panjang gelombang tunggal, densitometer sistem berkas ganda (secara ruang dan waktu) serta densitometer sistem berkas tunggal dan panjang gelombang ganda (Fried dan Sherma, 1994).

Densitometer sistem berkas tunggal dan panjang gelombang tunggal memberikan hasil analisis kuantitatif yang baik untuk lempeng KLT kinerja tinggi (HPTLC) yang homogen, tetapi untuk lempeng non-HPTLC seringkali memberikan garis dasar yang melayang (*drifting*) karena derau latar belakang (*background*) yang disebabkan oleh permukaan lempeng yang tidak rata. Hal ini dapat diatasi dengan teknik analisis yang cocok dan koreksi elektronik. Densitometer sistem berkas ganda dapat mengkompensasi adanya derau latar belakang (*background*) dan sumber cahaya. Densitometer sistem berkas ganda tidak diproduksi lagi. Densitometer sistem berkas tunggal dan panjang gelombang ganda memiliki dua monokromator dan sebuah “*chopper*” yang menggunakan dua panjang gelombang, yaitu panjang gelombang referensi (absorpsi minimal dari analit) dan panjang gelombang analisis (absorpsi maksimum dari analit), keduanya diukur pada waktu yang berbeda. Jenis ini akan mengoreksi penghamburan cahaya dan serapan palsu yang disebabkan oleh lempeng yang tidak murni dan tidak rata (Fried dan Sherma, 1994).

2.8.1 Analisis Kualitatif dengan KLT-Densitometri

Analisis kualitatif dengan KLT-Densitometri dapat dilakukan dengan cara penentuan harga Rf dan Rx yang telah dijelaskan pada sub bab 2.7 dan penentuan panjang gelombang maksimum, yaitu panjang gelombang pada saat harga serapannya maksimum. Jika suatu zat yang dianalisis memiliki panjang gelombang maksimum yang sama dengan panjang gelombang standar, maka kemungkinan zat tersebut sama dengan zat standar (Fried dan Sherma, 1994).

2.8.2 Analisis Kuantitatif dengan KLT-Densitometri

Analisis kuantitatif dari hasil pemisahan (kromatogram) dengan KLT dapat dilakukan dengan cara melakukan analisis sampel secara langsung (*“in situ”*) pada pelat KLT menggunakan densitometer. Analisis kuantitatif dengan densitometer menggunakan prinsip pengukuran area atau serapan noda analit. Metode pengukuran area secara *“in situ”* dapat mengurangi kesalahan perhitungan sebesar 5-15% (Fried dan Sherma, 1994).

2.9 Tinjauan tentang Ekstraksi Furazolidon

Beberapa metode ekstraksi furazolidon telah digunakan untuk mengekstraksi furazolidon dari sampel pakan ternak, makanan, daging babi dan unggas. Uni Eropa melaporkan suatu metode ekstraksi furazolidon dalam pakan ternak menggunakan ekstraktor Soxhlet dengan prosedur sebagai berikut : Timbang 5-20 gram sampel pakan ternak yang telah homogen dan merata (mengandung tidak lebih dari 1 mg furazolidon) dalam kolom ekstraksi berukuran 25x80 mm atau 28x100 mm. Kemudian dipindahkan ke Ekstraktor Soxhlet atau Twisselmann dan dilakukan ekstraksi dengan petroleum eter untuk menghilangkan lemak. Apabila menggunakan Ekstraktor Soxhlet, lakukan 13-17 kali perputaran solven (pelarut). Pindahkan kolom dari perangkat ekstraksi dan keringkan dari pelarutnya. Keringkan kolom ekstraksi dan sampel yang telah terekstraksi dengan udara panas. Tempatkan kolom ekstraksi yang telah kering dan isinya kedalam seperangkat ekstraktor dan lakukan ekstraksi dengan aseton, paling sedikit 25 kali perputaran solven apabila menggunakan Ekstraktor Soxhlet. Kemudian uapkan

ekstrak aseton hingga volume 5-10 ml pada penangas air dan dinginkan pada temperatur kamar (European Communities, 1978).

Cieri pada tahun 1978 melaporkan prosedur ekstraksi furazolidon dalam pakan ternak menggunakan pelarut aseton, Williams pada tahun 1978 menggunakan pelarut asetonitril-kloroform (4:1) dan Moretain, dkk. pada tahun 1979 menggunakan pelarut dimetilformamida (DMF). Jones pada tahun 1978 melaporkan metode ekstraksi furazolidon dalam pakan babi dan unggas menggunakan pelarut metanol – asam 2-N-hidroklorida (1:1) (The National Academy of Science, 2000). AOAC International melaporkan metode ekstraksi furazolidon dalam pakan ternak menggunakan pelarut aseton p.a.-air (93:7) (Horwits, 2000).

Cieri pada tahun 1979 melaporkan prosedur ekstraksi furazolidon dalam makanan menggunakan pelarut dimetilformamida (DMF)-aseton (1:1). Hoener pada tahun 1979 melaporkan metode ekstraksi furazolidon dalam daging kalkun menggunakan pelarut metanol (The National Academy of Science, 2000). Residu furazolidon dalam daging diekstraksi dengan pelarut asetonitril (Souza, dkk., 2001).

Ya-Min Kao, dkk. pada tahun 2001 melaporkan prosedur ekstraksi residu furazolidon dalam campuran daging babi dan ayam dengan cara sebagai berikut : Sampel daging babi dan ayam yang akan diuji dicampur sampai homogen. Campuran ini diambil sebanyak 5 gram, kemudian ditambahkan asetonitril sebanyak 50 ml dan dilakukan pencampuran dalam *mixer* selama 3 menit dan dilakukan filtrasi. Setelah dilakukan filtrasi, residu ditambahkan lagi asetonitril sebanyak 50 ml. Proses pencampuran dan filtrasi ini diulang beberapa kali. Kemudian filtrat dipindahkan kedalam corong pisah berisi 30 ml n-heksan jenuh asetonitril, kocok selama 5 menit. Fase asetonitril dikumpulkan, kemudian diuapkan pada suhu 40°C menggunakan rotavapor (Ya-Min Kao, dkk., 2001).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

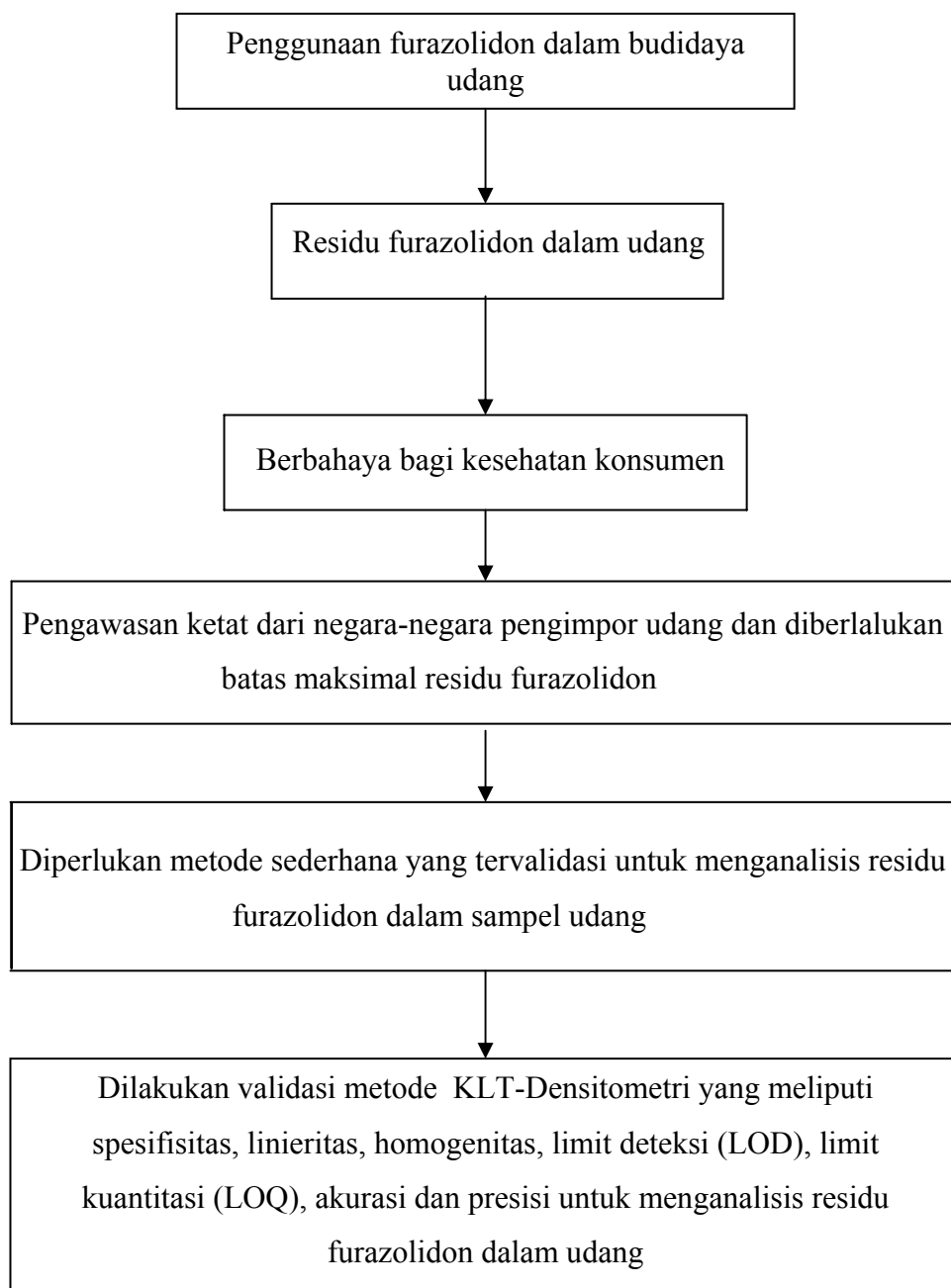
Furazolidon banyak digunakan dalam perikanan dan peternakan sebagai antibiotika untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit pada hewan ternak yang disebabkan oleh bakteri dan mikroba. Furazolidon digunakan oleh peternak udang di Indonesia, antara lain di Panti Benih Gondol (Bali) dan panti benih lainnya di Jawa Timur.

Residu furazolidon yang terdapat dalam makanan ternyata berdampak negatif bagi manusia yang mengkonsumsinya. Penggunaan furazolidon dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan kanker (karsinogenik) dan mutasi gen (mutagenik).

Berkenaan dengan hal ini negara-negara pengimpor udang dikawasan Eropa dan belahan dunia lainnya melakukan pengawasan yang ketat terhadap kandungan residu furazolidon dalam udang beku tersebut. Selain itu, negara-negara pengimpor udang memberlakukan batas maksimal residu furazolidon dalam udang. Produk udang yang mengandung residu furazolidon yang melebihi persyaratan tidak diterima oleh negara-negara pengimpor udang.

Salah satu metode yang dapat dilakukan untuk menganalisis residu furazolidon dalam udang adalah KLT-Densitometri. Validasi metode residu furazolidon dalam udang dengan KLT-Densitometri perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil analisis yang dapat dipercaya dan mendekati kebenaran. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode KLT-Densitometri yang tervalidasi untuk menganalisis kandungan furazolidon dalam sampel udang. Parameter validasi meliputi spesifisitas, linieritas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), akurasi dan presisi.

3.2 Bagan Kerangka Konseptual



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan

Sampel udang

Baku (standar) furazolidon (produksi SIGMA-Aldrich)

Asetonitril p.a. (produksi Merck)

Kloroform p.a. (produksi Merck)

Aseton teknis (produksi PT Dianum)

Pelat KLT Silika Gel GF 254 siap pakai (produksi Merck)

Air suling (aquadest)

4.2 Alat

CAMAG TLC Scanner 3 dengan Software CATS V4.06 tahun 1998

Lampu ultraviolet CAMAG

Bejana kromatografi

Mikropipet Eppendorf ukuran 100-1000 μ l

Pipa kapiler 5 μ l dan 10 μ l

Alat penotol CAMAG Nanomat 4

Timbangan analitik Sartorius BL 210S dengan kepekaan 0,0001 g

Timbangan analitik ALSEP dengan kepekaan 0,001 g

Ultrasonik Transsonic 890/H, Elma

Penggojok (*shaker*)

Alat-alat gelas

4.3 Validasi Metode Analisis

4.3.1 Spesifisitas

4.3.1.1 Fase Diam

Dalam penelitian ini digunakan fase diam pelat KLT silika gel GF 254 siap pakai (The National Academy of Science, 2000).

4.3.1.2 Pembuatan Larutan Baku Induk

Larutan baku induk furazolidon dibuat dengan cara menimbang 50,0 mg standar furazolidon, kemudian dilarutkan dalam asetonitril sampai volume 50 ml dalam labu ukur. Dipipet sebanyak 0,5 ml dan dimasukkan kedalam vial yang berukuran 2 ml. Selanjutnya, pelarut diuapkan sampai didapatkan standar furazolidon kering. Dengan demikian, dalam satu vial mengandung standar furazolidon sebanyak 0,50 mg. Kemudian 1 vial furazolidon dilarutkan dengan asetonitril sampai volume 10 ml sehingga didapatkan larutan baku induk furazolidon sebesar 50 ppm.

4.3.1.3 Pemilihan Fase Gerak

Larutan baku furazolidon 50 ppm sebanyak 10 µl ditotolkan pada pelat KLT silika gel GF 254. Selanjutnya dieluasi dengan 4 macam fase gerak, yaitu : kloroform-metanol (9:1), kloroform-aseton (7:3) (The National Academy of Science, 2000), etilasetat-heksan (2:1) (Sherma, 2002) dan kloroform-asetonitril (3:1).

Kemudian dilakukan pengamatan nilai R_f dari hasil eluasi dengan fase gerak-fase gerak tersebut. Fase gerak yang memiliki kekuatan yang baik untuk mengeluasi solut akan bergerak ke tengah pelat KLT (nilai $R_f = 0,2-0,8$) (Fried dan Sherma, 1994).

4.3.1.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku furazolidon 50 ppm ditotolkan sebanyak 10 µl pada pelat KLT silika gel GF 254. Kemudian dieluasi dengan fase gerak terpilih sampai garis tanda. Noda yang diperoleh diamati dengan densitometer. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan panjang gelombang yang memberikan serapan (puncak) paling tinggi.

4.3.2 Linieritas

4.3.2.1 Pembuatan Larutan Baku

Larutan baku furazolidon 50 ppm dipipet sebanyak 2 ml dan dilarutkan dalam asetonitril sampai volume 10 ml sehingga didapatkan kadar 10 ppm.

Kemudian dibuat larutan baku kadar 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm dan 6 ppm dengan cara memipet menggunakan mikropipet sebanyak 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 600 μ l larutan baku furazolidon 10 ppm, kemudian masing-masing ditambahkan asetonitril sampai 1 ml dalam vial.

4.3.2.2 Pembuatan Kurva Linieritas

Larutan baku 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm ditotolkan pada pelat KLT silika gel GF 254 masing-masing sebanyak 5 μ l kemudian dimasukkan kedalam bejana kromatografi yang telah jenuh dengan uap fase gerak, dieluasi sampai akhir pelat. Kemudian pelat diangkat dan dikeringkan. Noda yang dihasilkan diukur areanya pada panjang gelombang maksimum dengan densitometer.

Dari data dan area dapat dibuat persamaan regresi dengan rumus :

$$Y = BX + A$$

Dimana A=intersep

B=slope

X=konsentrasi zat yang ditotolkan

Y=area noda

Harga B dan A dapat ditentukan dengan rumus :

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

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

Hubungan korelasi (r) dapat dihitung dengan rumus :

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

4.3.3 Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara menotolkan sejumlah 5 µl kadar furazolidon 2 ppm dan 6 ppm pada pelat KLT. Masing-masing konsentrasi ditotolkan sebanyak 5 totolan. Kemudian diukur area serapannya dengan densitometer pada panjang gelombang maksimum terpilih. Harga PW atau harga F dihitung dengan rumus :

$$PW = (S_N^2/S_I^2)$$

dimana:

S_N : Standar deviasi (SD) konsentrasi terkecil

S_I : Standar deviasi (SD) konsentrasi terbesar

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

Membuat larutan baku dengan kadar 1,6 ppm; 1,8 ppm; 2,0 ppm; 2,2 ppm dan 2,4 ppm dengan cara dengan cara memipet menggunakan mikropipet sebanyak 160 µl, 180 µl, 200 µl, 220 µl dan 240 µl dari larutan baku 10,00 ppm, kemudian masing-masing ditambahkan asetonitril sampai 1 ml dalam vial.

Selanjutnya, ditotolkan pada pelat KLT silika gel GF 254 masing-masing sebanyak 5 µl. Kemudian dieluasi dan noda yang dihasilkan diukur area serapannya dengan densitometer dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) terpilih. Hasil pada kromatogram dihitung LOD (batas deteksi) dan LOQ (batas kuantitasi) dengan rumus :

$$C = (k \times S_D) / S$$

Dimana k : konstanta (untuk LOD=3, LOQ=10)

S : sensitivitas slope

S_D : standar deviasi serapan blanko (*analytical blank signal*)

C : konsentrasi pada LOD dan LOQ

4.3.5 Akurasi

4.3.5.1 Pengeringan Udang

Udang beku berupa bagian yang bisa dimakan (kepala, ekor dan kulit telah dibuang) ditempatkan pada timba atau ember yang berisi air sebanyak 8 kali berat udang beku. Diamkan sampai es mencair, setelah mencair udang dipindahkan pada keranjang berlubang dengan diameter ± 0.3 cm. Kemudian dimiringkan dan ditunggu selama 2 menit (Horwits, 2000), selanjutnya berat udang ditimbang. Setelah itu, dilakukan pengeringan udang dalam oven dengan suhu 60°C selama 24 jam, kemudian ditimbang beratnya.

Dilakukan perhitungan kandungan air dengan rumus :

% kandungan air yang hilang = $(\text{Berat udang basah} - \text{berat udang kering} / \text{berat udang basah}) \times 100 \%$

4.3.5.2 Preparasi Sampel

Sampel udang yang telah kering sebagaimana proses pada sub bab 4.3.5.1 diatas diblender sampai halus, kemudian ditimbang sebanyak 50,000 gram untuk keperluan pengujian akurasi dan presisi.

4.3.5.3 Penentuan Persen Rekoveri

Langkah pertama ditentukan kurva linieritas furazolidon untuk pengujian akurasi dan presisi dengan konsentrasi 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm sebagaimana tersebut pada sub bab 4.3.2.2.

Kemudian ditimbang 50,000 gram sampel udang kering dalam erlenmeyer 300 ml. Selanjutnya, ditambahkan standar furazolidon 50 μg , yaitu dengan cara menambahkan larutan furazolidon konsentrasi 50 ppm sebanyak 1 ml. Tambahkan asetonitril secukupnya (sampai permukaan asetonitril setinggi 0,5-1cm diatas matriks sampel). Kocok sampai larutan baku furazolidon homogen dalam sampel udang. Kemudian asetonitril diuapkan dalam lemari asam selama 1 jam dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 3 jam.

Selanjutnya ditambahkan larutan pengekstraksi aseton-aquadest (9:1) sebanyak 100 ml. Lakukan ultrasonikasi pada suhu 40°C selama 20 menit, kemudian digojok dengan *shaker* selama 3 menit. Selanjutnya dilakukan

pengendapan residu selama 5 menit, kemudian dilakukan dekantasi kedalam cawan porselen. Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak 5 kali. Selanjutnya, larutan ekstrak diuapkan dalam lemari asam sampai kering. Ekstrak yang telah kering dalam cawan porselen dilarutkan dalam 2 ml asetonitril sambil diaduk-aduk, ulangi sampai 4 kali, lalu dibilas dengan asetonitril secukupnya, kemudian larutan dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan asetonitril sampai garis tanda. Lakukan replikasi sampel dengan perlakuan seperti diatas sebanyak 6 kali. Sebagai blanko, lakukan seperti proses diatas, tetapi tanpa penambahan larutan baku furazolidon dan cukup dilakukan satu kali, tanpa replikasi.

Larutan baku furazolidon 5 kadar yang telah dibuat, 6 larutan sampel yang telah ditambahkan larutan baku furazolidon dan satu larutan sampel tanpa penambahan larutan baku furazolidon (blanko) ditotolkan masing-masing sebanyak 5 µl pada pelat KLT. Lakukan eluasi, tentukan nilai R_f, kemudian dilakukan pengukuran area noda dengan densitometer.

Kemudian dilakukan perhitungan persen rekovery dengan memasukkan area sampel kedalam persamaan regresi larutan baku untuk pengujian persen rekovery.

$$Y = Bx + A$$

dimana Y : area noda

x : berat standar furazolidon yang diperoleh kembali

A : intersep

Persen rekovery dihitung dengan rumus : $(A/B) \times 100 \%$

dimana A : jumlah standar furazolidon yang diperoleh kembali

B : jumlah standar furazolidon yang ditambahkan

4.3.6 Presisi

Setelah diperoleh data pengujian persen rekovery dari 6 sampel udang yang telah ditambahkan standar furazolidon, kemudian dilakukan pengujian presisi metode analisis berdasarkan harga KV (Koefisien Variasi) dengan rumus :

$$KV = \left(\frac{SD}{\bar{x}} \right) \times 100 \%$$

Dimana : KV = koefisien variasi

SD = standar deviasi

$\bar{x}$ = rata-rata

Kadar furazolidon terkecil dalam sampel udang yang dapat terdeteksi dapat ditentukan seperti prosedur pada sub bab 4.3.5.2 dan 4.3.5.3 dengan penimbangan sampel dan penambahan standar furazolidon sebagai berikut :

Tabel IV.1 Penimbangan sampel udang dan penambahan standar furazolidon

Jumlah Udang Kering (g)	Jumlah Furazolidon (μg)	Kadar Furazolidon dalam Udang Kering (ppm)
10	50	5
25	50	2
50	50	1
100	50	0,5
20	2	0,1
10	2	0,2
100	1	0,01
100	0,1	0,001

Penambahan standar furazolidon dengan jumlah 50 μ g dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah 1 ml standar furazolidon dengan kadar 50 ppm. Penambahan standar furazolidon dengan jumlah 2 μ g dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah 200 μ l standar furazolidon dengan kadar 10 ppm. Penambahan standar furazolidon dengan jumlah 1 μ g dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah 100 μ l standar furazolidon dengan kadar 10 ppm. Sedangkan penambahan standar furazolidon dengan jumlah 0,1 μ g dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah 10 μ l standar furazolidon dengan kadar 10 ppm.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Spesifisitas

5.1.1 Hasil Pengamatan Pembuatan Larutan Baku

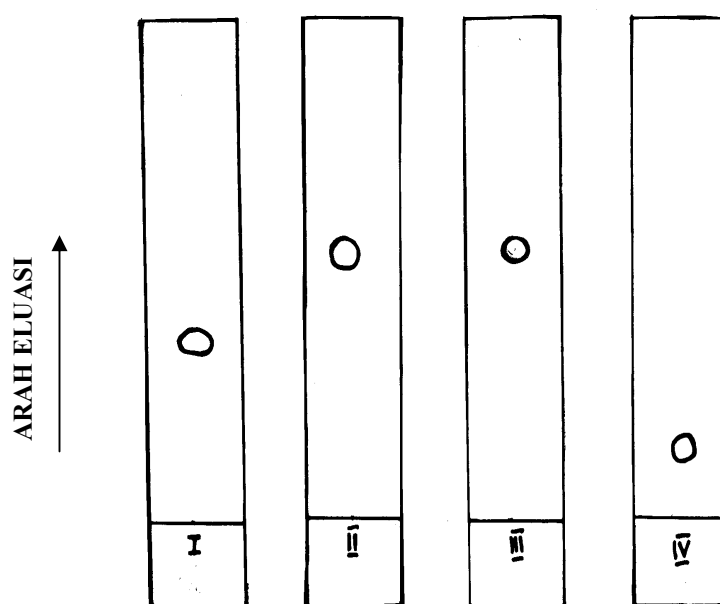
Standar furazolidon yang ditimbang sebanyak 51,4 mg, sehingga larutan baku induk furazolidon memiliki konsentrasi 51,4 ppm.

5.1.2 Hasil Pengamatan Pemilihan Fase Gerak

Noda furazolidon pada pelat KLT silika gel GF 254 yang diamati dengan sinar ultraviolet (u.v) berwarna ungu. Hasil pengamatan pemilihan fase gerak dapat dilihat pada tabel V.1 dan gambar 5.1.

Tabel V.1 Hasil pengamatan harga Rf beberapa fase gerak

Komposisi fase gerak	Harga Rf
Kloroform-aseton (7:3)	0,39
Kloroform-metanol (9:1)	0,58
Etil asetat-heksan (2:1)	0,15
Kloroform-asetonitril (3:1)	0,66



Gambar 5.1 Hasil eluasi beberapa fase gerak

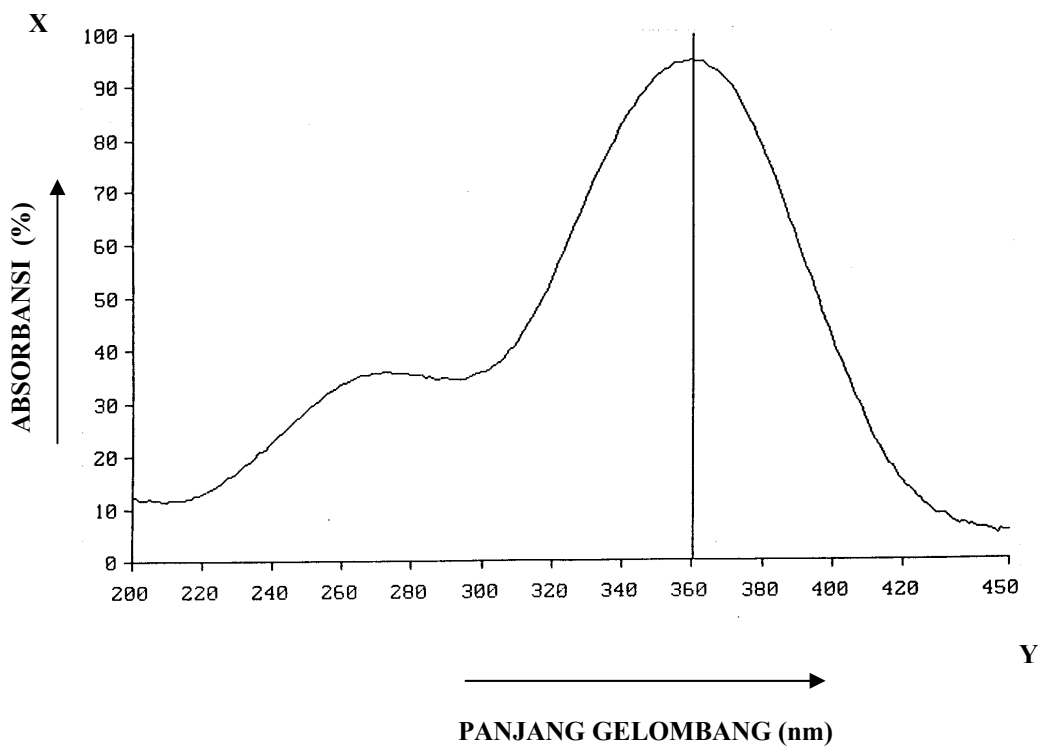
Keterangan gambar :

- I. Fase gerak kloroform-aseton (7:3)
- II. Fase gerak kloroform-metanol (9:1)
- III. Fase gerak kloroform-asetonitril (3:1)
- IV. Fase gerak etil asetat-heksan (2:1)

Berdasarkan hasil pada tabel dan gambar diatas, maka fase gerak terpilih adalah kloroform-asetonitril (3:1).

5.1.3 Hasil Pengamatan Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Hasil pengamatan penentuan panjang gelombang (λ) maksimum dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Spektrum furazolidon

Furazolidon memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 270 nm dan 360 nm. Panjang gelombang maksimum yang terpilih adalah 360 nm.

5.2 Linieritas

Hasil pengamatan linieritas dapat dilihat pada tabel V.2, gambar 5.3 dan 5.4.

Tabel V.2 Hasil pengamatan linieritas furazolidon

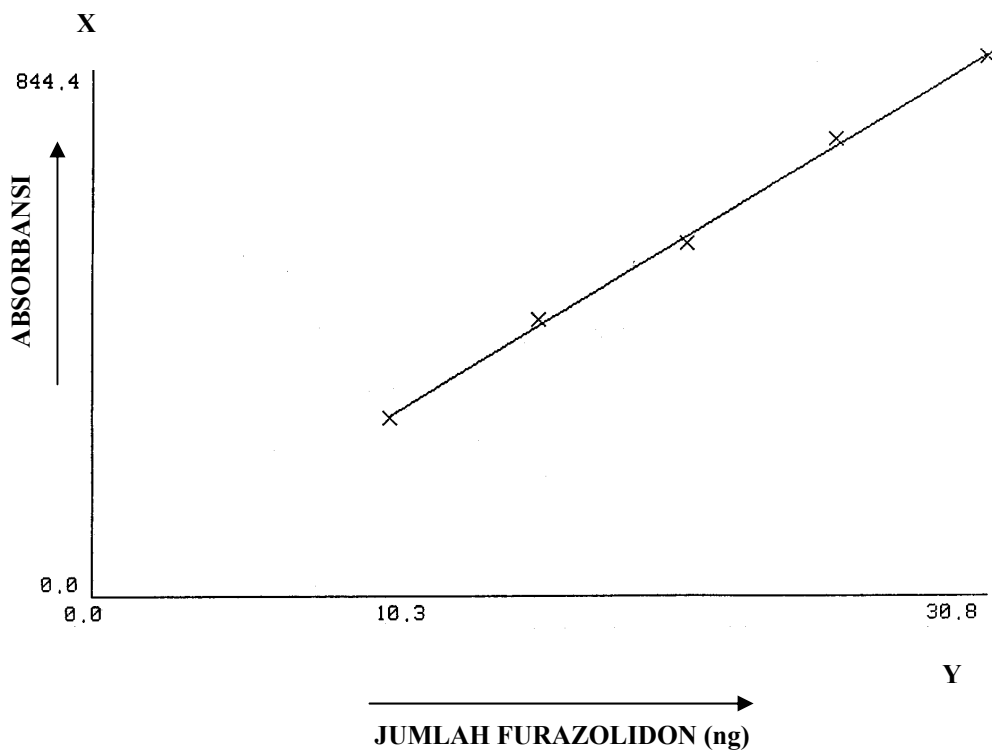
Kadar (ppm)	Jumlah (ng)	Area
2,056	10,28	279,7
3,084	15,42	433,1
4,112	20,56	554,4
5,140	25,7	717,9
6,168	30,84	844,4

Dari data diatas didapatkan :

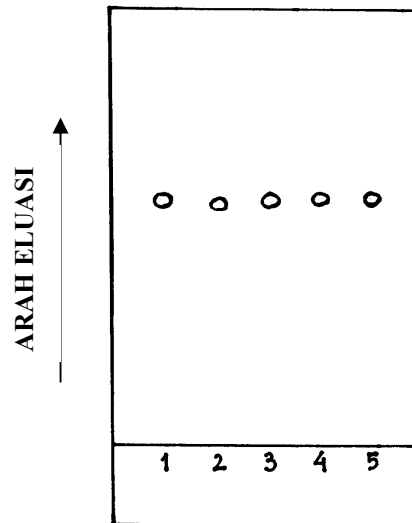
harga $r = 0,9991$

persamaan garis regresi : $Y = 27,51X + 0,23$

$V_{xo} = 1,90 \%$



Gambar 5.3 Kurva linieritas furazolidon



Gambar 5.4 Hasil eluasi pengujian linieritas furazolidon

Keterangan gambar :

Titik 1 : larutan furazolidon konsentrasi 2,056 ppm

Titik 2 : larutan furazolidon konsentrasi 3,084 ppm

Titik 3 : larutan furazolidon konsentrasi 4,112 ppm

Titik 4 : larutan furazolidon konsentrasi 5,14 ppm

Titik 5 : larutan furazolidon konsentrasi 6,168 ppm

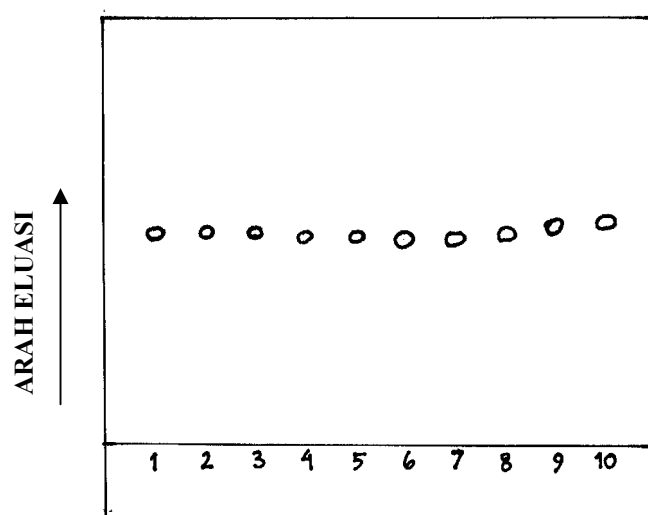
5.3 Homogenitas

Hasil pengamatan homogenitas furazolidon pada kadar 2,056 ppm dan 6,168 ppm dapat dilihat pada tabel V.3 dan gambar 5.5.

Tabel V.3 Hasil pengamatan homogenitas furazolidon

Jumlah (ng)	Area	Jumlah (ng)	Area
10,28	381,0	30,84	1047,8
10,28	378,9	30,84	1251,3
10,28	438,1	30,84	1115,6
10,28	319,2	30,84	994,4
10,28	345,2	30,84	1119,6
	SL=44,7290		SN=96,4763

$$PW = SN^2 / SL^2 = 4,6522$$



Gambar 5.5 Hasil eluasi pengujian homogenitas furazolidon

Keterangan gambar :

Titik 1-5 : larutan furazolidon konsentrasi 2,056 ppm

Titik 6-7 : larutan furazolidon konsentrasi 6,168 ppm

5.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

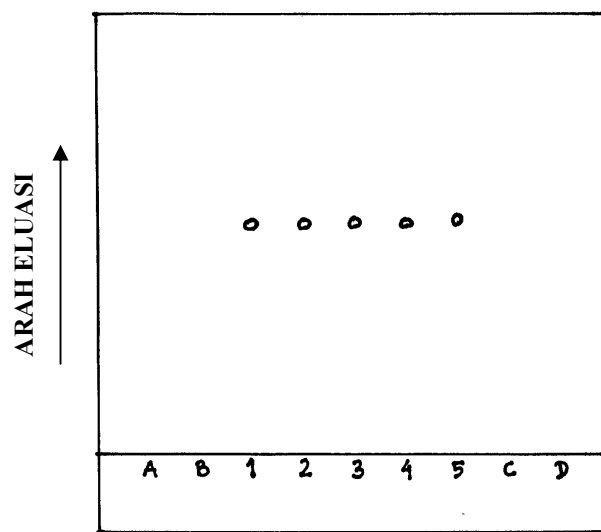
Hasil pengamatan LOD dan LOQ furazolidon dapat dilihat pada tabel V.4 dan V.5 serta gambar 5.6.

Tabel V.4 Hasil pengamatan serapan blanko

Jumlah (ng)	Area
-	48,6
-	0
-	10,2
-	20,2

Tabel V.5 Hasil pengamatan serapan furazolidon

Kadar (ppm)	Jumlah (ng)	Area
1,6448	8,224	219,1
1,8504	9,252	303,1
2,056	10,28	356,4
2,2616	11,308	368,9
2,4672	12,336	426,2

**Gambar 5.6** Hasil eluasi penentuan LOD dan LOQ furazolidon

Keterangan gambar :

Titik A, B, C dan D : blanko (asetonitril)

Titik 1 : larutan furazolidon konsentrasi 1,6448 ppm

Titik 2 : larutan furazolidon konsentrasi 1,8504 ppm

Titik 3 : larutan furazolidon konsentrasi 2,056 ppm

Titik 4 : larutan furazolidon konsentrasi 2,2616 ppm

Titik 5 : larutan furazolidon konsentrasi 2,4672 ppm

Kemudian dilakukan perhitungan dengan hasil sebagai berikut :

Standar deviasi (SD) serapan blanko = 20,9268

Persamaan garis regresi : $Y = 46,69X - 145,26$

Harga $r = 0,9722$

$$\text{LOD} = (3 \times \text{SD}) / \text{SI} = 1,34 \text{ ng}$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{SD}) / \text{SI} = 4,48 \text{ ng}$$

5.5 Akurasi

5.5.1 Hasil Pengamatan Pengeringan Udang

Hasil pengamatan kandungan air yang hilang dapat dilihat pada tabel V.6.

Tabel V.6 Hasil pengamatan pengeringan udang

Udang Basah (g)	Udang Kering (g)	Kandungan air yang Hilang (%)
100,410	18,178	81,90
100,395	18,120	81,95
100,594	18,529	81,58

Rata-rata kandungan air yang hilang = 81,81 %

5.5.2 Hasil Pengamatan Persen Rekoveri

Hasil pengamatan persen rekoveri dapat dilihat pada tabel V.7 dan V.8 serta gambar 5.7.

Tabel V.7 Hasil pengamatan persen rekoveri furazolidon

Udang Kering (g)	Udang Basah (g)	Area	Furazolidon		Rekoveri (%)
			Ditambahkan(μg)	Diperoleh(μg)	
50,030 (blanko)	90,960 (blanko)	-	-	-	-
50,068	91,029	626,2	51,4	38,68	75,25
50,076	91,043	535,9	51,4	32,56	63,35
50,041	90,976	608,9	51,4	37,50	72,96
50,087	91,063	436,6	51,4	25,82	50,23
50,052	90,100	537,7	51,4	32,68	63,58
50,048	90,992	758,5	51,4	47,66	92,72
$\bar{x} = 50,057$	$\bar{x} = 90,880$				

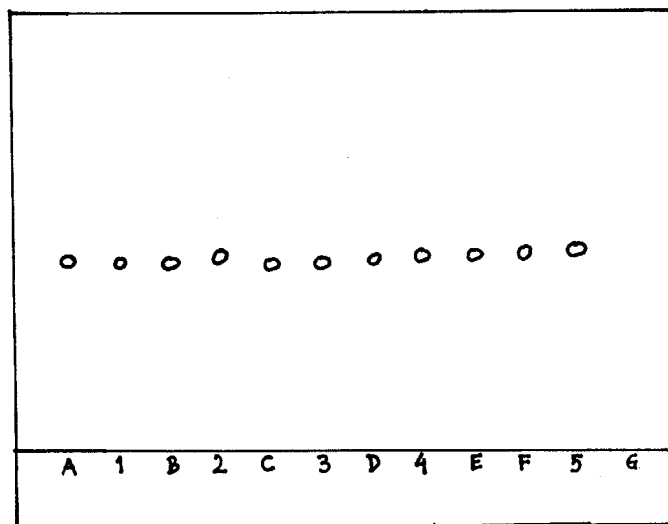
Rata-rata persen rekoveri = 69,68 %

Tabel V.8 Hasil pengamatan serapan standar furazolidon untuk kurva baku

Kadar (ppm)	Jumlah (ng)	Area
2,056	10,28	373,2
3,084	15,42	503,1
4,112	20,56	658,5
5,140	25,7	798,9
7,196	35,98	1128,9

Persamaan garis regresi : $Y = 29,49X + 55,83$

Harga $r = 0,9991$

**Gambar 5.7** Hasil eluasi penentuan akurasi dan presisi furazolidon

Keterangan gambar :

A-F : larutan sampel udang dengan penambahan standar furazolidon dengan kadar 1 ppm terhadap udang kering

1-5 : larutan standar furazolidon dengan konsentrasi masing-masing 2,056; 3,084; 4,112; 5,140; 7,196 ppm

G : blanko (sampel udang tanpa penambahan standar furazolidon)

5.6 Presisi

Hasil pengamatan presisi dapat dilihat pada tabel V.9 dan gambar 5.7.

Tabel V.9 Hasil pengamatan presisi furazolidon

Udang Basah (g)	Udang Kering (g)	Area	Furazolidon	
			Ditambahkan(μg)	Diperoleh(μg)
90,960 (blanko)	50,030 (blanko)	-	-	-
91,029	50,068	626,2	51,4	38,68
91,043	50,076	535,9	51,4	32,56
90,976	50,041	608,9	51,4	37,50
91,063	50,087	436,6	51,4	25,82
90,100	50,052	537,7	51,4	32,68
90,992	50,048	758,5	51,4	47,66

Rata-rata ($\bar{x}$) jumlah furazolidon yang diperoleh kembali = 35,82 μg

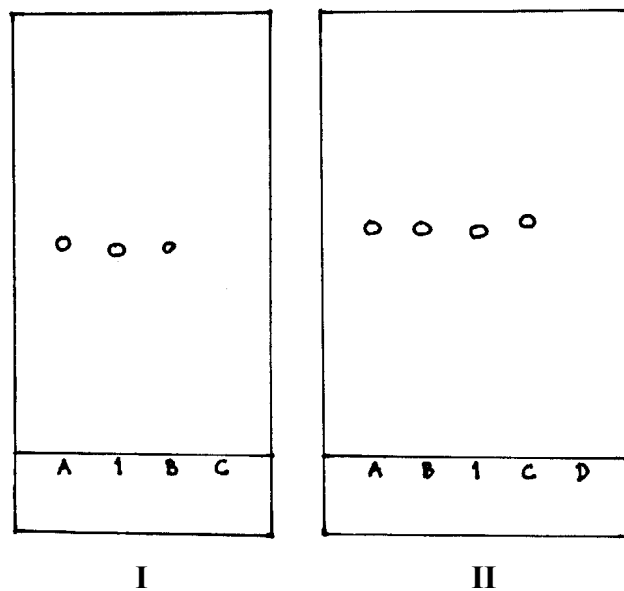
Standar deviasi (SD) = 7,37 μg

Koefisien variasi (KV) = $(\text{SD} / \bar{x}) \times 100 \% = 20,58 \%$

Hasil pengamatan kadar furazolidon terkecil dalam sampel udang yang dapat terdeteksi dapat dilihat pada tabel V.10.

Tabel V.10 Hasil pengamatan kadar furazolidon dalam sampel udang

Udang Basah (g)	Udang Kering (g)	Furazolidon (μg)	Kadar Furazolidon dalam Udang Basah (ppm)	Terdeteksi/Tidak	Area	Harga Rf
18,486	10,168	51,4	2,78	terdeteksi	1236,3	0,59
45,669	25,119	51,4	1,125	terdeteksi	1287,6	0,59
90,100	50,030	51,4	0,57	terdeteksi	1042,5	0,61
182,019	100,115	51,4	0,282	terdeteksi	806,5	0,55
38,271	21,050	2,056	0,053	tidak	-	-
18,236	10,030	2,056	0,112	tidak	-	-
182,312	100,276	1,028	0,005	tidak	-	-
182,119	100,170	0,1028	0,0006	tidak	-	-



Gambar 5.8 Hasil eluasi pengamatan kadar furazolidon dalam sampel udang

Keterangan gambar :

I : larutan sampel yang berisi standar furazolidon dengan kadar 0,282 dan 0,57 ppm terhadap udang basah, dimana :

A : larutan sampel dengan kadar furazolidon 0,282 ppm

B : larutan sampel dengan kadar furazolidon 0,57 ppm

1 : larutan standar furazolidon 5,140 ppm

C : blanko (larutan sampel udang tanpa penambahan standar furazolidon)

II: larutan sampel yang berisi standar furazolidon dengan kadar 0,57 sampai 2,78 ppm terhadap udang basah, dimana :

A : larutan sampel dengan kadar furazolidon 2,78 ppm

B : larutan sampel dengan kadar furazolidon 1,125 ppm

C : larutan sampel dengan kadar furazolidon 0,57 ppm

1 : larutan standar furazolidon 5,140 ppm

D : blanko (larutan sampel udang tanpa penambahan standar furazolidon)

BAB VI

PEMBAHASAN

Fase gerak yang dipilih dalam penelitian ini adalah kloroform-asetonitril (3:1). Fase gerak ini memiliki harga $R_f=0,66$. Hal ini berarti fase gerak kloroform-asetonitril (3:1) memiliki kekuatan yang baik untuk mengeluasi furazolidon sehingga mampu bergerak ke tengah pelat KLT. Fase gerak yang baik mampu mengeluasi solut sehingga bergerak dengan harga $R_f=0,2-0,8$ (Fried dan Sherma, 1994). Sedangkan fase gerak etil asetat-heksana (2:1) memiliki harga R_f yang kurang baik, yaitu 0,15. Berarti fase gerak ini tidak memiliki kekuatan yang cukup untuk mengeluasi furazolidon sehingga tidak mampu bergerak ketengah pelat KLT. Fase gerak campuran kloroform-asetonitril (3:1) bersifat non polar karena komposisi kloroform lebih banyak dibandingkan asetonitril. Kloroform bersifat non polar dan asetonitril bersifat semi polar. Hasil pengamatan pemilihan fase gerak furazolidon dapat dilihat pada tabel V.1 dan gambar 5.1.

Furazolidon memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 270 dan 360 nm. Furazolidon pada panjang gelombang 360 nm menghasilkan serapan sebesar $\pm 95\%$, sedangkan pada panjang gelombang 270 nm serapannya hanya sebesar $\pm 35\%$. Hal ini berarti furazolidon memberikan serapan yang maksimum pada panjang gelombang 360 nm. Selain itu, serapan furazolidon pada panjang gelombang 360 nm menghasilkan puncak yang jelas dan tegas. Maka panjang gelombang maksimum terpilih adalah 360 nm. Hasil pengamatan penentuan panjang gelombang maksimum furazolidon dapat dilihat pada gambar 5.2.

Pengujian linieritas furazolidon menghasilkan suatu kurva linieritas 5 kadar furazolidon dengan persamaan garis $Y=27,51X+0,23$ dan harga koefisien korelasi $(r)=0,9991$. Harga hitung r harus lebih besar dari 0,99 (APVMA, 2003). Dengan demikian, harga r hitung 0,9991 memenuhi persyaratan. Harga V_{xo} yang diperoleh sebesar 1,90%. Harga ini memenuhi persyaratan, yaitu tidak boleh lebih dari 2% (Indrayanto, 1994). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa ada korelasi linier antara kadar furazolidon dan area serapan pada daerah 5 konsentrasi uji tersebut. Hasil pengamatan linieritas furazolidon dapat dilihat pada tabel V.2,

gambar 5.3 dan 5.4, sedangkan perhitungan harga r dan V_{xo} dapat dilihat pada lampiran 1.

Uji homogenitas furazolidon dilakukan pada konsentrasi terkecil dan terbesar dari pengujian linieritasnya. Pengujian homogenitas menghasilkan harga PW atau F hitung=4,6522. Sedangkan harga F tabel untuk 5 pasang data dengan derajat kepercayaan 0,05 adalah 6,39 (data harga F dapat dilihat pada lampiran 7). Hal ini berarti PW lebih kecil dari harga F tabel, sehingga uji homogenitas memenuhi persyaratan dan kurva kalibrasi homogen. Hasil pengamatan homogenitas furazolidon dapat dilihat pada tabel V.3 dan gambar 5.5, sedangkan perhitungan harga PW dapat dilihat pada lampiran 2.

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) furazolidon dilakukan pada 5 konsentrasi kecil mulai dari kadar 1,6448 ppm sampai 2,4672 ppm yang ditotolkan sebanyak 5 μ l pada pelat KLT. Selanjutnya dilakukan perhitungan yang menghasilkan harga LOD=1,34 ng dan LOQ=4,48 ng. Hal ini berarti residu furazolidon dalam udang dapat dideteksi dan diukur apabila jumlahnya sama dengan atau lebih besar dari harga LOD, yaitu 1,34 ng atau sebesar 0,268 ppm. Persyaratan batas residu maksimum (MRLs) furazolidon yang dikeluarkan Republik Slovakia adalah 5 μ g/kg sampel atau sebesar 5 ppb (Departemen Kesehatan Republik Slovakia, 2002). Sedangkan US FDA menetapkan ketentuan “tidak ada residu” antibiotika yang ditemukan dalam makanan (Gibbons, 2002). Hal ini berarti batas deteksi hasil penelitian tidak dapat mendeteksi residu furazolidon dengan kadar dibawah 0,268 ppm. Hasil pengamatan LOD dan LOQ furazolidon dapat dilihat pada tabel V.4 dan V.5 serta gambar 5.6, sedangkan perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada lampiran 3.

Pada uji akurasi dan presisi, penimbangan sampel udang kering sebanyak ± 50 gram. Sedangkan kandungan air yang hilang saat pengeringan sebesar 81,81%. Dengan demikian, berat udang basah sebelum pengeringan adalah ± 91 gram. Penambahan standar furazolidon sebanyak 51,4 μ g, sehingga kadar furazolidon dalam sampel udang kering sebesar $\pm 1,03$ ppm dan dalam sampel udang basah sebesar $\pm 0,57$ ppm. Hasil pengamatan pengeringan udang dapat

dilihat pada tabel V.6, sedangkan perhitungan jumlah udang basah dapat dilihat pada lampiran 4.

Pengujian akurasi yang dinyatakan dengan persen rekovery didapatkan harga sebesar 69,68%. Persyaratan persen rekovery menurut US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) untuk analisis residu dalam produk pertanian, makanan dan pakan ternak sebesar 70-120%. Menurut EU CVMP (*European Union Committee for Veterinary Medicinal Products*), persyaratan harga persen rekovery untuk analit dengan jumlah sama dengan atau lebih besar dari 1 µg/kg sampel (1 ppb) adalah 70-110%. Sedangkan menurut US FDA (*United States Food and Drug Administration*), harga persen rekovery untuk analit dengan jumlah sama dengan atau lebih besar dari 100 µg/kg sampel (0,1 ppm) adalah 80-110%. Dengan demikian, hasil penentuan persen rekovery furazolidon tidak memenuhi persyaratan yang dikeluarkan ketiga lembaga diatas. Hasil pengamatan persen rekovery furazolidon dapat dilihat pada tabel V.7, V.8 dan gambar 5.7, sedangkan contoh perhitungan persen rekovery dapat dilihat pada lampiran 4.

Pengujian presisi yang dinyatakan dengan harga RSD (*Relative Standar Deviation*) atau KV (koefisien variasi) didapatkan harga sebesar 20,58%. Persyaratan harga KV menurut US EPA untuk analisis residu dalam produk hasil pertanian, makanan dan pakan ternak sebesar 20%. Menurut US FDA, persyaratan KV untuk analit dengan jumlah sama dengan atau lebih besar dari 100 µg/kg sampel (0,1 ppm) adalah 10%. Sedangkan EU CVMP mensyaratkan harga KV sebesar 15% untuk analit dengan jumlah lebih besar dari 100 µg/kg sampel (0,1 ppm). Dengan demikian, harga KV furazolidon tidak memenuhi persyaratan yang dikeluarkan ketiga lembaga diatas. Hasil pengamatan presisi furazolidon dapat dilihat pada tabel V.9, sedangkan perhitungan presisi dapat dilihat pada lampiran 5.

Ekstraksi furazolidon dari sampel udang dilakukan dengan pelarut campuran aseton teknis-aquadest (9:1). Penambahan aquadest ini dilakukan untuk mendapatkan pelarut yang lebih polar dari aseton, sehingga kelarutan furazolidon dalam pelarut campuran ini lebih besar. AOAC International merekomendasikan pelarut campuran aseton-air (9,3:0,7) untuk mengekstraksi furazolidon dalam

pakan ternak. Perbedaan komposisi pelarut pengestraksi ini kemungkinan mempengaruhi hasil ekstraksi. Dalam prakteknya, penggunaan aseton p.a. (*pro analysis*) memberikan hasil yang relatif sama dibanding aseton teknis. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan aseton teknis karena harganya lebih murah dibanding aseton p.a. dan tidak mempengaruhi proses-proses analisis furazolidon selanjutnya. Metode ekstraksi furazolidon dalam matriks udang pada penelitian ini tidak dilakukan proses penarikan lemak (*defatting*) matriks udang. Fase gerak kloroform-asetonitril (3:1) mampu memisahkan komponen lemak dalam matriks udang dengan furazolidon. Komponen lemak dalam matriks udang memisah ke bagian atas pelat KLT.

Akurasi dan presisi metode yang kurang baik dipengaruhi oleh teknik ekstraksi. Ketidaktepatan alat dalam pengukuran (*measurement error*) dapat mempengaruhi hasil analisis karena setiap alat memiliki ketelitian dan ketepatan yang berbeda. Semakin kecil jumlah analit dalam sampel yang dianalisis, maka akurasi dan presisi suatu metode dapat semakin menurun.

Pada penelitian dilakukan analisis furazolidon dalam sampel udang basah dengan kadar 0,0006 ppm (0,6 ppb) sampai 2,78 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar furazolidon 0,282 sampai 2,78 ppm dapat terdeteksi oleh densitometer, sedangkan kadar dibawah 0,282 ppm tidak terdeteksi. Kadar furazolidon terkecil yang dapat terdeteksi dalam sampel udang sebesar 1,4 ng. Sedangkan harga batas deteksi (LOD) metode analisis sebesar 1,34 ng, sehingga jumlah furazolidon terkecil yang dapat terdeteksi dalam sampel udang lebih besar daripada harga batas deteksi (LOD) metode analisis. Secara kualitatif, analit yang terdeteksi adalah furazolidon karena memiliki harga R_f dan λ maksimum yang relatif sama dengan standar furazolidon dalam asetonitril yang ditotolkan pada pelat KLT. Hasil pengamatan kadar furazolidon terkecil dalam sampel udang yang dapat terdeteksi dapat dilihat pada tabel V.10 dan gambar 5.8.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan hasil penelitian validasi metode KLT-Densitometri untuk analisis residu furazolidon dalam udang sebagai berikut :

1. Parameter validasi metode analisis yang telah dilakukan meliputi spesifisitas dengan fase diam silika gel GF 254, fase gerak kloroform-asetonitril (3:1), panjang gelombang maksimum furazolidon 360 nm; linieritas dengan harga $r=0,9991$ dan $V_{xo}=1,90\%$; homogenitas furazolidon dengan harga $PW=4,6522$; batas deteksi (LOD) sebesar 1,34 ng; batas kuantitasi (LOQ) sebesar 4,48 ng; akurasi yang dinyatakan dengan persen rekovery sebesar 69,68% dan presisi yang dinyatakan dengan harga KV sebesar 20,58%.
2. Hasil pengujian spesifisitas, linieritas dan homogenitas memenuhi persyaratan. Sedangkan hasil pengujian akurasi dan presisi tidak memenuhi persyaratan.

7.2 Saran

Perlu dilakukan perbaikan teknik ekstraksi furazolidon dalam sampel udang sehingga didapatkan akurasi dan presisi metode analisis KLT-Densitometri yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, R. 1987. **Sample Pretreatment and Separation**. John Wiley and Sons, pp. 229
- Angelini, N. M., dkk. 1997. **Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurans Residues in Bovine Muscle Tissue**. Journal of AOAC International, vol. 80, no. 3, pp. 481-485
- Anonim 2002. **The United States Pharmacopeia**. 25th edition. Rockville : United States Pharmacopeial, Inc., pp. 2256
- APVMA (*Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority*). 2003. **Draft Guidelines for the Validation of Analytical Methods**. http://www.apvma.gov.au/guidelines/analytical_methods.pdf
- Budavari, S (Ed.). 2001. **The Merck Index**. 13th edition. New Jersey : Merck Research Laboratories Division of Merck and Co. Inc., pp. 763
- Burlage, H. M., dkk. 1963. **Physical and Technical Pharmacy**. New York : The Mc Graw-Hill Book Company., pp. 232
- Departemen Kesehatan Republik Slovakia. 2003. **Maximum Residue Batass (MRLs)**. <http://www.piwet.pulawy.pl>
- Departemen Perikanan Daerah Tingkat I Jawa Timur. 2000. **Data Ekspor Produk Perikanan Tahun 2000**. Surabaya : Departemen Perikanan Jawa Timur
- Departemen Pertanian Malaysia. 2002. **Pencegahan dan Kawalan Penyakit**. <http://www.agrolink.moa.my>
- Dunn, W.J., dkk. (Eds). 1986. **Partition Coefficient, Determination and Estimation**. New York : Pergamon Press, pp. 38-39
- European Communities. 1978. **European Communities Regulations, Methods of Analysis of the Component of Feeding Stuff and Premixtures**. <http://www.europa.eu.int>
- Fried, B. and Sherma, J. 1994. **Thin Layer Chromatography, Techniques and Applications**. 3rd edition, revised and expanded, New York : Marcel Dekker, Inc.
- Gennaro, G (Ed.). 1995. **Remington : The Science and Practice of Pharmacy**. Vol. II, Pennsylvania : Mack Publishing Company, pp.1521
- Gibbons, J. H. 2002. **Drug in Live Stock Feed**. <http://www.wws.princeton.edu>
- Hamilton, R. and Hamilton, S. 1987. **Thin Layer Chromatography**. John Wiley & Sons., pp. 2, 13
- Hongkong Legislative Council. 2001. **Public Health (Animals and Birds) Chemical Residue Regulation and Harmful Substances in Food (Amandment) Regulation**. <http://www.legco.gov.hk>

- Hoogenboom, L.A.P., dkk. 2002. **Absorption of a Genotoxic Metabolite Released from Protein-Bound Residues of Furazolidone**. <http://www.rikilt.dlo.nl>
- Horwits, W.(Ed.).2000. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 7th ed, vol. I, The Scientific Association., pp. 12-13
- Indrayanto, G. 1994. **Validasi Metode pada Analisis dengan Kromatografi**. Bulletin ISFI Jatim. Vol. 22 no. 1. Jawa Timur : Penerbit BPD-ISFI Jatim
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. **Validation of TLC Analyses**. Encyclopedia of Chromatography, Marcel Dekker, Inc.
- James, K. C. 1986. **Solubility and Related Properties**. New York and Basel : Marcel Dekker, Inc., pp. 281
- Kellner, R., dkk (Eds.). 1998. **Analitical Chemistry**. Wiley-VCH, pp.159
- Khopkar, S. M. 1990. **Konsep Dasar Kimia Analitik**. Jakarta : Universitas Indonesia Press., hal. 156
- Martin, A. 1993. **Physical Pharmacy**. 4th edition, Baltimore : Lippincott Williams, pp. 239-240
- Moffats, A. C. (Ed). 1986. **Clarke's Isolation and Identification of Drugs In Pharmaceutical, Body Fluids and Post-Mortem Material**. 2nd edition, London : The Pharmaceutical Press, pp. 566
- Moriarty, D. J. W. 1999. **Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria**. Halifax, Canada : Atlantic canada Society for Microbial Ecology
- Mulya, M. 1983. **Pemakaian Thin-Layer Chromato Scanner untuk Analisa Kuantitatif**. Bulletin ISFI Jatim tahun XV, no.1-2, Jawa Timur : Penerbit BPD-ISFI Jatim
- Mulya, M. 1996. **Pengantar Metode Analisis Kromatografi**. Surabaya : University Press IKIP, hal. 7-14, 71-72
- Mulya, M dan Suharman. 1995. **Analisis Instrumental**. Surabaya : Airlangga University Press, hal. 143-147, 223-229
- Nordlander, I. 2003. **Examination of Residues in Live Animals and Animals Products, Result of the Control 2003**, pp. 22. <http://www.slv.se>
- O'Keefe, M, dkk. 1999. **Protein-Bound Veterinary Drug Residues in Food**. <http://www.teagasc.ie/research>
- Olin, R. B. (Ed). 2001. **Drug Facts and Comparisons**. 55th edition, St. Louis: Walter Kluwer Company, pp. 1385-1386
- Parfitt, K. (Ed). 1999. **Martindale, The Complete Drug Reference**. 32 th edition, Pharmaceutical Press, pp. 583
- Poole, C. F and Poole, S. K. 1994. **Chromatography Today**. Elsevisier, pp. 704, 720
- Rikilt-DLO. 2002. **Nitrofurane/Furazolidone**. <http://www.rikilt.dlo>

- RSSL. 2002. **Nitrofurane in Food**. [http:// www.rssl.com/food-e](http://www.rssl.com/food-e)
- Readnour, R. S, dkk. 2003. **Sampling and Analyses of Foodstuffs from Animal Origin**. Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA, pp. 300-321. <http://www.spectroscopynow.com>
- Roth, H. J. and Blaschke, G. 1994. **Analisis Farmasi**. Yogyakarta : UGM Press, hal. 402
- Rukyani, A, dkk. 1997. **Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia**. Volume III, no. 1. <http://www.dkp.go.id>
- Scoog, D.A., dkk. 1998. **Principles of Instrumental Analysis**. 5 th ed., Harcourt Bruce and Company, pp. 674-675, 762, 764
- Sherma, J. 2000. **Thin Layer Chromatography in Food and Agricultural Analysis**. Journal of Chromatography A, 880 (2000), pp. 129-147. <http://www.elsevier.com>
- Soekardjo, Prof. Dr. 1997. **Kimia Fisika**. Jakarta : Rineka Cipta, hal. 241-247
- Souza, S. V. C, dkk. 2001. **Determination of Nitrofurazone, Furazolidone and Nicarbazin Residues in Animal Tissues**. <http://www.scielo.br>
- Steel, G. D. and Torrie, J. H. 1991. **Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik**. Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama, hal. 691
- Touchstone, J. C. and Dobbins, M. F. 1983. **Practice of Thin Layer Chromatography**. 2nd ed., John Wiley & Sons., pp. 256
- Ya-Min Kao, dkk. 2001. **Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Chicken and Swine Muscles by High Performance Liquid Chromatography**. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 9, No. 2, 2001, p. 84-95. <http://www.nfld.gov.tw>

Lampiran 1

Perhitungan Linieritas Furazolidon

Jumlah (ng)	Area (Y)	X²	X.Y	Y²
10,28	279,7	105,6784	2875,316	78232,09
15,42	433,1	237,7764	6678,402	187575,61
20,56	554,4	422,7136	11398,464	307359,36
25,7	717,9	660,49	18450,03	515380,41
30,84	844,4	951,1056	26041,296	713011,36
$\Sigma=102,8$	$\Sigma=2829,5$	$\Sigma=2377,764$	$\Sigma=65443,508$	$\Sigma=1801558,83$

$$r = \frac{n \cdot \Sigma(X.Y) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{\sqrt{\{(n \cdot \Sigma X^2) - (\Sigma X)^2\} \{(n \cdot \Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2\}}}$$

$$r = \frac{5 \cdot 65443,508 - 102,8 \cdot 2829,5}{\sqrt{\{(5 \cdot 2377,764) - (102,8)^2\} \{(5 \cdot 1801558,83) - (2829,5)^2\}}}$$

$$r = \frac{327217,54 - 290872,6}{\sqrt{(11888,82 - 10567,84) - (9007794,15 - 8006070,25)}}$$

$$r = \frac{36344,94}{\sqrt{1320,98 \cdot 1001723,9}}$$

$$r = \frac{36344,94}{\sqrt{1323257237}}$$

$$r = \frac{36344,94}{36376,60288}$$

$$r = 0,9991$$

$$B = \frac{n \cdot \Sigma(X.Y) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$B = \frac{5 \cdot 65443,508 - (102,8)(2829,5)}{5 \cdot 2377,764 - (102,8)^2}$$

$$B = \frac{327217,54 - 290872,6}{11888,82 - 10567,84}$$

$$B = \frac{36344,94}{1320,98}$$

$$B = 27,5136$$

$$A = \frac{\Sigma Y - (B \cdot \Sigma X)}{n}$$

$$A = \frac{2829,5 - (27,5136 \cdot 102,8)}{5}$$

$$A = \frac{2829,5 - 2828,39808}{5}$$

$$A = \frac{1,10192}{5}$$

$$A = 0,2204$$

Persamaan garis regresi : $Y = BX + A$

$$Y = 27,5136X + 0,2204$$

Perhitungan V_{xo} :

Jumlah furazolidon (ng)	Area	$Y_i = bX_i + a$	$\Sigma (Y - Y_i)^2$
10,28	279,7	283,0328	11,1076
15,42	433,1	424,4342	75,0961
20,56	554,4	565,8356	130,7729
25,7	717,9	707,237	113,6996
30,84	844,4	848,6384	17,9640
$\bar{x} = 20,56$			

$$S_y = \sqrt{\frac{\Sigma (Y - Y_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{384,6402}{3}} = 10,78$$

$$S_{xo} = S_y/b = 10,78/27,51 = 0,39$$

$$V_{xo} = (S_{xo}/\overline{x}) \times 100 \%$$

$$V_{xo} = (0,39/20,56) \times 100 \%$$

$$V_{xo} = 1,90 \%$$

Lampiran 2

Perhitungan Homogenitas Furazolidon

Jumlah (ng)	Area	Jumlah (ng)	Area
10,28	381,0	30,84	1047,8
10,28	378,9	30,84	1251,3
10,28	438,1	30,84	1115,6
10,28	319,2	30,84	994,4
10,28	345,2	30,84	1119,6
	SL=44,7290		SN=96,4763

$$PW = SN^2 / SL^2$$

$$(96,4763)^2$$

$$PW = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(44,7290)^2$$

$$9307,6764$$

$$PW = \frac{\quad}{\quad}$$

$$2000,6834$$

$$PW = 4,6522$$

Lampiran 3

Perhitungan LOD dan LOQ Furazolidon

Tabel hasil pengamatan serapan blanko

Jumlah (ng)	Area
-	48,6
-	0
-	10,2
-	20,2

Perhitungan SD (standar deviasi) blanko :

Area (x)	$ x - \bar{x} ^2$
48,6	832,3225
0	390,0625
10,2	91,2025
20,2	0,2025
$\bar{x} = 19,75$	$\Sigma = 1313,79$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma |x - \bar{x}|^2}{n-1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{1313,79}{4-1}}$$

$$SD = 20,9268$$

Tabel hasil pengamatan serapan furazolidon

Kadar (ppm)	Jumlah (ng)	Area
1,6448	8,224	219,1
1,8504	9,252	303,1
2,056	10,28	356,4
2,2616	11,308	368,9
2,4672	12,336	426,2

Perhitungan LOD dan LOQ :

Standar deviasi (SD) serapan blanko = 20,9268

Persamaan garis regresi : $Y = 46,69X - 145,26$

Harga $r = 0,9722$

$LOD = (3 \times SD) / SI$

$LOD = (3 \times 20,9268) / 46,69$

$LOD = 1,34 \text{ ng}$

$LOQ = (10 \times SD) / SI$

$LOQ = (10 \times 20,9268) / 46,69$

$LOQ = 4,48 \text{ ng}$

Lampiran 4

Perhitungan Persen Rekoveri Furazolidon

- Contoh perhitungan jumlah sampel udang basah :

Diketahui :

- Jumlah sampel udang kering = 50,030 g
- Kadar air yang hilang = 81,81 %

Perhitungan :

$$\text{Jumlah sampel udang basah} = (81,81/100) \times 50,030 \text{ g}$$

$$\text{Jumlah sampel udang basah} = 90,960 \text{ g}$$

- Contoh perhitungan persen rekoveri :

I. Diketahui :

- Standar furazolidon yang ditambahkan : 51,4 μg
- Persamaan garis regresi : $Y = 29,49X + 55,83$
- Area analit (furazolidon) : 626,2
- Area blanko : -

Perhitungan :

$$626,2 = 29,49X + 55,83$$

$$X = 19,34 \text{ ng}/5\mu\text{l}$$

$$\text{Dalam } 10 \text{ ml} = 19,34 \times 2000 = 38680 \text{ ng} = 38,680 \mu\text{g}$$

$$\text{Persen rekoveri} = (38,680 \mu\text{g}/51,4 \mu\text{g}) \times 100 \% = 75,25 \%$$

II. Diketahui :

- Standar furazolidon yang ditambahkan : 51,4 µg
- Persamaan garis regresi : $Y = 29,49X + 55,83$
- Area analit (furazolidon) : 535,9
- Area blanko : -

Perhitungan :

$$535,9 = 29,49X + 55,83$$

$$X = 16,28 \text{ ng/5}\mu\text{l}$$

$$\text{Dalam 10 ml} = 16,28 \times 2000 = 32560 \text{ ng} = 32,560 \mu\text{g}$$

$$\text{Persen rekovery} = (32,560 \mu\text{g}/51,4 \mu\text{g}) \times 100 \% = 63,35 \%$$

Lampiran 5

Perhitungan Presisi Furazolidon

Tabel hasil pengamatan presisi furazolidon

Jumlah Udang Basah (g)	Jumlah Udang Kering (g)	Area	Jumlah Furazolidon	
			Ditambahkan(μg)	Diperoleh(μg)
90,960 (blanko)	50,030 (blanko)	-	-	-
91,029	50,068	626,2	51,4	38,68
91,043	50,076	535,9	51,4	32,56
90,976	50,041	608,9	51,4	37,50
91,063	50,087	436,6	51,4	25,82
90,100	50,052	537,7	51,4	32,68
90,992	50,048	758,5	51,4	47,66
				$\bar{x} = 35,82$
				$SD = 7,37$

Koefisien variasi (KV) = $(SD / \bar{x}) \times 100 \%$

KV = $(7,37/35,82) \times 100 \%$

KV = 20,58 %

Lampiran 6

Tabel Harga F (Steel dan Torrie, 1991)

Lampiran 7

Hasil *Scanning* Linieritas Furazolidon

Lampiran 8

Hasil *Scanning* Homogenitas Furazolidon

Lampiran 9

Hasil *Scanning* LOD dan LOQ Furazolidon

Lampiran 10

Hasil *Scanning* Akurasi dan Presisi Furazolidon

Lampiran 11

Hasil *Scanning* Kadar Furazolidon dalam Sampel Udang

