

PERBANDINGAN METODE PENENTUAN KADAR OKSITETRASIKLIN DALAM UDANG DENGAN KLT-DENSITOMETRI DAN KLT-BIOAUTOGRAFI

FRITA YANUAR ANGRANI, ACHMAD TOTO POERNOMO, ISNAENI

Departemen Kimia Farmaasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

e-mail: isna.yudi@gmail.com

ABSTRACT

A simple Thin Layer Chromatography (TLC) Densitometry and TLC-Bioautography has been used for identification and quantification of oxytetracycline. Validation both of the methods has been developed for determination of oxytetracycline in shrimp, included parameter linearity, accuracy (recovery), precision (CV), limit of detection, and limit of quantification, as a purpose to verifying that the parameters is appropriate with literature. The TLC of oxytetracycline has been carried out by using silica gel GF254 impregnated by EDTA 1% was used as a stationary phase, while chloroform: methanol : sodium EDTA 1% (55:25:10, v/v) was used as mobile phase. Retardation factor (Rf) of Oxytetracycline obtained by this system was 0,44. Staphylococcus aureus was used as a bacterial test on the bioautography method. The analyte spots were quantified by using densitometry method at 365 nm. The response was found to be linear at the amount of oxytetracycline between 100 ppm - 500 ppm. Oxytetracycline's regression line equation was $Y = 9992,1091X - 1861,706$, r value = 0,9916, and $V_{xo} = 7,9332\%$ for densitometry and $Y = 0,8573X - 7,5901.10^{-3}$, r value = 0,9942, and $V_{xo} = 1,6743\%$ for bioautography. Recovery and CV were $61,7450\% \pm 2,4737$ and $6,8402\%$ for densitometry, and $59,7287\% \pm 2,9133$ and $4,8775\%$ for the bioautography. Limit of detection value was 12,10 ppm and 20,04 ppm for densitometry and bioautography respectively. Limit of quantitation value was 40,35 for densitometry, and 50,10 ppm for bioautography. Conclusion, all the validation parameters were appropriate with standard reference, except accuracy and precision, but the methods can be applied for determining oxytetracycline in shrimp, and there's no meaning difference between both of them for determining oxytetracycline in shrimp for accuration parameter. The precision of TLC-Densitometry was better than TLC-Bioautography.

Keywords : validation, oxytetracycline, TLC-Densitometry, bioautography, shrimp

PENDAHULUAN

Oksitetrasiklin merupakan salah satu antibiotik yang sering ditambahkan pada budidaya udang sebagai antisipasi pencegahan penyakit, karena toksisitasnya rendah dan berspektrum luas, terutama terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Residu oksitetrasiklin pada produk makanan hewani dapat menyebabkan reaksi alergi pada manusia dan meningkatkan resiko resistensi antibiotik terhadap mikroorganismenya. Metode untuk mengontrol produk makanan hewani perlu dikembangkan terkait keberadaan residu antibiotik yang biasanya dalam konsentrasi satuan ppb. Kontrol dapat dilakukan dengan metode analisis antibiotik secara kualitatif dan kuantitatif. Profil analisis oksitetrasiklin telah dilaporkan oleh Yuwono dan Indrayanto (2005). Metode analisis yang digunakan untuk determinasi oksitetrasiklin antara lain *Ion-pair High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Aranda, 2006), Kromatografi Planar dan mikrobiologi (Ramirez, 2002; Ratnasari, 2009). Efektivitas monitoring kandungan oksitetrasiklin dalam matriks udang memerlukan metode yang valid

(Puradewa, 2006), murah, mudah, dan relatif cepat. Salah satu metode yang diharapkan memenuhi kriteria tersebut adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada penelitian ini akan dikaji dua metode yang dikembangkan dari KLT, yaitu metode KLT-Densitometri dan KLT-Bioautografi. Choma (2005) telah berhasil menganalisis beberapa senyawa antimikroba dengan KLT-bioautografi. Penelitian bertujuan untuk membuktikan bahwa kedua metode tersebut dapat diimplementasikan pada penapisan residu antibiotik dalam matriks udang. Penelitian juga bertujuan untuk membandingkan validitas dan kemampuan kedua metode tersebut mendeteksi residu oksitetrasiklin dalam matriks udang. Penggunaan kedua metode ini divalidasi untuk kontrol kualitas produk-produk makanan hewani. Parameter validasi yang digunakan meliputi linearitas, akurasi (recovery), presisi (KV), limit deteksi dan limit kuantitasi.

Analisis oksitetrasiklin dengan metode KLT-Densitometri dilakukan dengan penotolan ekstrak udang pada lempeng KLT, kemudian diekstraksi, dan hasilnya diukur dengan Densitometer. Metode KLT-

Bioautografi dilakukan sama dengan KLT, setelah eluasi, lempeng KLT dikeringkan dan bagian lempeng yang mengandung noda analit diletakkan di atas permukaan media *nutrient agar* yang telah diinokulasi dengan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dilanjutkan dengan proses difusi. Lempeng KLT diangkat dari permukaan agar, selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat

Neraca analitik (Sartorius); bejana kromatografi (Camag); Lempeng KLT silica gel GF254; cawan Petri diameter 9 cm dan 15 cm; *hair dryer*; vortex; kawat Öse; inkubator (Memmert); pipa kapiler; pipet mikro (Socorex); jangka sorong (Tricle brand); *autoclave* (Huxley HV-340 Speedy); Densitometer (SHIMADZU TLC Scanner); lampu UV; Scanner (CANON, CanoScan LiDE 25, Color Image Scanner, 1200 x 2400 dpi optical resolution).

Bahan

Oksitetrasiklin HCl p.g; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; agar (AA); serbuk *Nutrient Broth* (Difco); larutan salin (NaCl 0,9%); air suling; kloroform p.a., metanol p.a., natrium EDTA, dan udang

Tahapan dan Prosedur Penelitian

Preparasi Media

Media *nutrient agar* 500 mL dibuat dengan cara mencampurkan 9 gram agar dengan serbuk *nutrient broth* 4 gram, kemudian ditambah air suling sampai 500 mL dalam gelas *Beaker*, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga campuran larut dan homogen. Selanjutnya media yang masih cair tersebut segera diambil dengan spuit dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 10 mL, 15 mL, dan 20 mL. Tabung yang berisi media tersebut ditutup dengan kapas, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf 121°C selama 15 menit. media 10 mL yang masih cair dimiringkan hingga padat. Media tersebut digunakan sebagai media peremajaan mikroba uji. Media 15 mL dan 20 mL digunakan sebagai media persediaan untuk uji bioautografi. Media uji bioautografi dibuat dua lapis, masing-masing lapis sebanyak 15 mL dan 20 mL. Lapisan bawah sebagai media dasar (*base layer*) sebanyak 20 mL dan lapisan atas sebagai media

perbenihan mikroba (*seed layer*) sebanyak 15 mL (Depkes, 2014).

Penyiapan Bakteri Uji

Koloni *Staphylococcus aureus* dari kultur persediaan diambil dengan kawat Öse sebanyak satu Öse, digoreskan pada permukaan agar miring dan diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Setelah terjadi pertumbuhan, dibuat suspensi bakteri dengan menambahkan 10 mL larutan salin steril pada biakan agar miring, kemudian suspensi dikocok sampai dengan vortex sampai seluruh koloni terlepas dari agar. Kerapatan optik suspensi bakteri diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm, dilakukan pengaturan volume sampai diperoleh transmittan 25% (Depkes, 2014).

Pembuatan Larutan Baku Induk Oksitetrasiklin

Ditimbang teliti oksitetrasiklin sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam metanol sampai 100,0 mL (1000 ppm).

Pembuatan Larutan Baku Kerja Oksitetrasiklin

Dibuat berbagai kadar larutan baku kerja oksitetrasiklin dari larutan baku induk oksitetrasiklin 1000 ppm yang diencerkan dengan metanol. Larutan baku kerja digunakan untuk penentuan parameter-parameter validasi.

Preparasi Sampel

Penentuan Susut Pengerinan Udag

Udag diblender, kemudian ditimbang 50 gram udang basah (3x), dikeringkan pada suhu 105°C. Udag kering ditimbang tiap jam sampai didapatkan berat yang konstan dan dihitung rata-rata berat kering.

Preparasi Larutan Oksitetrasiklin dalam sampel udang

Ditimbang seksama 2 gram udang kering. Matriks udang ditambah (*spiking*) larutan standar oksitetrasiklin dengan kadar minimal sesuai dengan Kadar Hambat Minimum (KHM). Pada penelitian ini, ditambahkan 3 mL, 4 mL, dan 5 mL larutan yang diambil dari larutan induk oksitetrasiklin 1000 ppm setara dengan 15 mg, 20 mg, dan 25 mg oksitetrasiklin. Udag diekstraksi dua kali masing-masing dengan 20 mL n-heksana menggunakan ultrasonikator selama 20 menit, dikocok dengan

shaker selama 5 menit, didiamkan sebelum didekantir. Lapisan n-heksana dibuang, residu diekstraksi kembali dengan 40 mL metanol dengan ultrasonikator selama 20 menit, dikocok dengan shaker selama 5 menit, didiamkan, kemudian larutan metanol disaring dan ditampung dalam labu ukur 50 ml. Metanol ditambahkan ke dalam labu ukur sampai tepat tanda (50 mL), kemudian ditotolkan pada lempeng KLT menggunakan pembanding standar oksitetrasiklin.

Penentuan Fasa Gerak

Kromatografi Lapis Tipis oksitetrasiklin dilakukan dengan cara menotolkan masing-masing larutan baku kerja oksitetrasiklin. Sebelum dilakukan penotolan, lempeng KLT diimpregnasi terlebih dahulu dengan natrium EDTA 1%, dikeringkan selama 30 menit di dalam oven bersuhu 105°C. Volume penotolan 10 µL pada lempeng KLT dengan ukuran 10 x 3 cm, kemudian lempeng KLT dieluasi menggunakan tiga macam fasa gerak yang berbeda yaitu Kloroform: metanol: Na EDTA 1% (60,:25:5, v/v) (Ratnasari, 2009), kloroform: metanol: aseton: larutan ammonia 1% (10:22:50:18, v/v) (Xie, 1997), kloroform: metanol: natrium EDTA 5% (65:20:5, v/v) (Yuwono, 2005). Orientasi fasa gerak juga dilakukan dengan merubah perbandingan komponen yaitu kloroform: methanol : natrium EDTA 1% dengan komposisi 55:25:10 (v/v).

Lempeng KLT yang telah dieluasi dikeringkan menggunakan aliran udara panas dan diamati noda yang terbentuk dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm (Depkes, 2014). Dipilih fasa gerak yang dapat memisahkan oksitetrasiklin dari matriks dengan sempurna dan tidak *tailing*. Noda yang tampak diberi tanda, kemudian dihitung nilai R_f oksitetrasiklin (Ratnasari, 2009).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku Oksitetrasiklin 300 ppm, matriks udang (blanko), matriks udang+oksitetrasiklin ditotolkan 10 µL pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan fasa gerak kloroform: metanol: Na EDTA 1% (55:25:10, v/v). Noda diamati dengan Densitometer. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan panjang gelombang yang memberikan serapan paling besar.

Validasi Metode Bioautografi

Larutan ekstrak udang yang telah ditambah oksitetrasiklin pada konsentrasi tertentu ditotolkan sebanyak 10 µl pada lempeng KLT, dieluasi dengan larutan fasa gerak terpilih. Setelah dikeringkan dengan mengalirkan udara panas untuk menghilangkan sisa fasa gerak, lempeng diletakkan pada permukaan media *Nutrient Agar* yang telah diinokulasi dengan *Staphylococcus aureus* ATCC, kemudian disimpan selama beberapa jam pada suhu 12°C selama 1 jam, sehingga terjadi proses difusi antibiotik secara sempurna. pelat KLT dikeluarkan dan cawan Petri diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona jernih yang menunjukkan lokasi penghambatan bakteri oleh antibiotik (Choma, 2003).

Penentuan Konsentrasi untuk Uji Respon Hambat

Pada penentuan konsentrasi untuk uji respon hambat, dilakukan pengenceran larutan baku induk oksitetrasiklin dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, dan 300 ppm. Masing-masing larutan ditotolkan pada lempeng KLT tanpa eluasi, tahap selanjutnya dilakukan seperti tahap bioautografi.

Penentuan Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan penotolan larutan baku kerja Oksitetrasiklin dengan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm sebanyak 10 µL pada lempeng KLT dan dieluasi dengan fasa gerak terplih. Setelah didapatkan area hambat hasil uji bioautografi, ditentukan koefisien korelasi (r) dan koefisien korelasi fungsi (V_{x_0}) antara diameter area hambat dengan logaritma konsentrasi. Linearitas metode bioautografi dikatakan valid apabila harga koefisien korelasi (r) lebih besar dari r Tabel atau harga koefisien variasi fungsi (V_{x_0}) tidak lebih dari 2% (Tiryaki, 2006).

Penentuan Akurasi

Ditimbang seksama 2 gram udang sebanyak empat kali, tiga kelompok replikasi udang diadisi dengan oksitetrasiklin 15 mg, 20 mg, dan 25 mg, satu kelompok replikasi tanpa oksitetrasiklin digunakan sebagai blanko, kemudian dilakukan tahapan

preparasi seperti tahapan sebelumnya.

Masing-masing kelompok replikasi tersebut ditotolkan pada lempeng KLT, dieluasi dengan fasa gerak terplih. Hasil eluasi diuji dengan bioautografi kontak, diameter zona hambat diukur, kemudian diplotkan pada kurva linearitas, sehingga didapatkan sebuah konsentrasi (kadar yang diperoleh), kemudian dihitung harga persen rekoverti.

Akurasi dinyatakan memenuhi persyaratan validasi jika persen rekoverti yang diperoleh 80%-120% (Harmita, 2004).

Penentuan Presisi

Penentuan presisi dilakukan dengan menotolkan larutan ekstrak udang yang mengandung oksitetrasiklin dengan konsentrasi 15 mg; 20 mg; dan 25 mg sebanyak 10 µL pada lempeng KLT. Masing-masing konsentrasi direplikasi tiga kali, kemudian dieluasi dengan fasa gerak terplih. Hasil eluasi diuji dengan bioautografi kontak, diameter zona hambat diukur dan dihitung harga SD untuk perhitungan harga KV.

Nilai presisi (KV) dapat diterima sebagai parameter validasi yang memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 5% (Skoog, 1980).

Penentuan Batas Deteksi

Penentuan batas deteksi dilakukan pada konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 dan 70 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 10 µL, selanjutnya dieluasi dengan fasa gerak terplih. Hasil eluasi diuji dengan bioautografi, diameter zona hambat diukur. Batas deteksi ditentukan melalui harga Kadar Hambat Minimal (KHM) oksitetrasiklin. Konsentrasi terkecil yang dibutuhkan oksitetrasiklin untuk dapat menunjukkan aktivitas menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ditetapkan sebagai batas deteksi.

Penentuan Batas Kuantitasi

Batas kuantitasi ditentukan melalui penghitungan dari rumus 3x harga batas deteksi, kemudian diplotkan dalam persamaan garis regresi yang linier, sehingga akan didapatkan konsentrasi oksitetrasiklin terkecil dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Validasi Metode KLT-Densitometri

Larutan oksitetrasiklin pada konsentrasi tertentu ditotolkan sejumlah 10 µL pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan larutan fasa gerak terplih. Setelah dieluasi, lempeng KLT dikeringkan pada suhu kamar, kemudian diamati nodanya pada lampu UV dan dihitung luas area noda kromatogram dengan Densitometer.

Penentuan Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan penotolan larutan baku kerja pada konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm sebanyak 10 µL pada lempeng KLT (untuk parameter linieritas dan akurasi), kemudian dieluasi dengan fasa gerak terplih. Setelah mencapai batas eluasi, lempeng diangkat dan dikeringkan pada suhu kamar. Noda diamati dengan lampu UV. Luas area noda diukur dengan densitometer, kemudian dicari korelasi antara konsentrasi analit yang ditotolkan dengan luas area.

Penentuan Akurasi

Ditimbang seksama 2 gram udang sebanyak empat kali, tiga kelompok replikasi udang diadisi dengan oksitetrasiklin 15 mg, 20 mg, dan 25 mg, satu kelompok replikasi yang lain digunakan sebagai blanko, kemudian dilakukan preparasi seperti tahapan sebelumnya.

Masing-masing kelompok replikasi ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 10 µL (dilakukan dalam satu lempeng KLT dengan parameter linieritas). Setelah dieluasi dengan fasa gerak terplih. Hasil eluasi dikeringkan pada suhu kamar, dan noda yang didapat diamati di bawah lampu UV. Luas area dan profil spektra noda diukur dengan densitometer dan dihitung persen perolehan kembali (% rekoverti).

Akurasi dinyatakan memenuhi persyaratan jika persen rekoverti yang diperoleh 80%-120% (Harmita, 2004).

Penentuan Presisi

Penentuan presisi dilakukan dengan menotolkan larutan baku kerja konsentrasi 15 mg; 20 mg; dan 25 mg sebanyak 10 µL pada lempeng KLT. Masing-masing konsentrasi direplikasi tiga kali, kemudian dieluasi dengan fasa gerak terplih. Hasil eluasi diukur area nodanya dengan densitometer. Harga SD

dihitung untuk menetapkan harga KV. Nilai presisi dinyatakan memenuhi syarat apabila KV tidak lebih dari 5% (Skoog, 1998).

Penentuan Batas Deteksi

Penentuan Batas Deteksi dilakukan dengan menotolkan beberapa seri konsentrasi larutan oksitetrasiklin pada rentang konsentrasi yang digunakan untuk penentuan linieritas, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 10 μ L, selanjutnya dieluasi dengan fasa gerak terpilih. Hasil eluasi dikeringkan pada suhu kamar, dan diamati nodanya pada lampu UV.

Luas area noda dihitung dengan densitometer. Batas deteksi ditentukan melalui perhitungan dengan rumus: $C = k \cdot SD \cdot S$. (C = Konsentrasi pada batas deteksi dan batas kuantitasi, S = Slope, k = Konstanta, 3 untuk batas deteksi, 10 untuk batas kuantitasi SD = Standar Deviasi serapan blanko) (Indrayanto, 1994)

Penentuan Batas Kuantitasi

Penentuan batas kuantitasi dilakukan bersamaan dengan penentuan batas deteksi. Masing-masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 10 μ L, selanjutnya dieluasi dengan fasa gerak terpilih. Hasil eluasi dikeringkan pada suhu kamar, dan diamati nodanya di bawah lampu UV. Luas area noda diukur dengan densitometer. Dari area noda tersebut dapat ditentukan batas kuantitasi dengan rumus: $C = k \cdot SD \cdot S$ (C = Konsentrasi pada Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi, S = Slope, k = Konstanta, 3 untuk Batas Deteksi, 10 untuk Batas Kuantitasi, SD = Standar Deviasi serapan blanko). (Indrayanto, 1994): Limit kuantitasi ditentukan melalui penghitungan berdasarkan rumus di atas, sehingga akan didapatkan konsentrasi oksitetrasiklin terkecil dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Fasa Gerak

Pada penentuan fasa gerak terpilih, dilakukan optimasi eluen yang dapat memberikan pemisahan yang optimal. Dari empat macam sistem eluen yang digunakan, diperoleh satu eluen (2) yang memberikan harga Rf $0,44 \pm$ (Tabel 1), karena relatif lebih stabil/reproduksibel dibandingkan sistem

yang lain. Sebelum dilakukan eluasi, lempeng KLT diimpregnasi dengan Na EDTA 1% untuk mengoptimalkan pemisahan.

Tabel 1. Perbandingan harga Rf berbagai sistem eluen

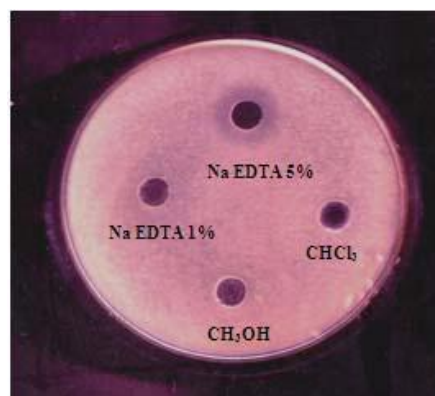
Fasa Gerak	Harga Rf			Rf rata-rata
	I	II	III	
Eluen	0,21	0,19	0,23	$0,21 \pm$
Eluen	0,55	0,70	0,65	$0,63 \pm$
Eluen	0,19	0,16	0,18	$0,18 \pm$
Eluen	0,46	0,43	0,43	$0,44 \pm$

Keterangan :

Eluen 1 = Kloroform: metanol: Na EDTA 1% (60:25:5, v/v), Eluen 2 = Kloroform: metanol: aseton: Larutan ammonia 1% (5:11:25:9, v/v), Eluen 3 = Kloroform: metanol: Na EDTA 5% (65:20:5, v/v), Eluen 4 = Kloroform: metanol: Na EDTA 1% (55:25:10, v/v).

Uji Daya Hambat Komponen Fasa Gerak

Uji daya hambat masing-masing komponen fasa gerak terpilih terhadap bakteri uji dilakukan dengan metode sumur (*hole*). Sebanyak 50 μ L larutan diuji aktivitas daya hambatnya terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Gambar 1. Hasil uji daya hambat komponen eluen terhadap mikroba uji dengan metode difusi menggunakan sumur (*hole*) sebagai pencadang.

Daya hambat terhadap bakteri uji hanya diberikan oleh diberikan Na-EDTA 5%, sehingga untuk impregnasi digunakan Na-EDTA 1% (Gambar 1).

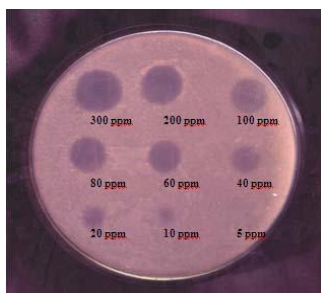
Penentuan Konsentrasi Antibiotik untuk Uji Respon Hambat

Hasil penentuan daya hambat larutan baku kerja oksitetrasiklin konsentrasi 300 200, 100, 80, 60, 40, 20, 10, dan 5 ppm menunjukkan bahwa pada rentang konsentrasi tersebut oksitetrasiklin masih menunjukkan daya hambat terhadap bakteri uji (Tabel 3 dan Gambar 2).

Tabel 3. Hasil penentuan konsentrasi oksitetrasiklin untuk uji respon hambat

Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm)
5	-
10	5,40
20	7,10
40	13,30
60	14,32
80	16,31
100	18,31
200	21,30
300	23,40

Larutan oksitetrasiklin mulai menunjukkan aktivitas dan menghasilkan zona hambat pada konsentrasi 10 ppm. Selanjutnya data ini digunakan sebagai referensi untuk penentuan parameter linearitas, akurasi dan presisi, serta penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) atau limit deteksi oksitetrasiklin.



Gambar 2. Hasil uji respon hambat larutan oksitetrasiklin tanpa eluasi pada lempeng KLT pada konsentrasi 5 ppm – 300 ppm.

Validasi Metode Bioautografi

1. Penentuan Linieritas

Hasil uji dan perhitungan parameter linear dengan KLT-bioautografi (Tabel 4 dan Gambar 3) menunjukkan bahwa parameter linearitas memenuhi persyaratan validasi, karena nilai r hitung $>$ r Tabel,

yaitu 0,950 (Hadi, 2000), dan nilai V_{x_0} kurang dari 2% (Tiryaki, 2006).

Tabel 4. Hasil perhitungan parameter linieritas oksitetrasiklin dengan KLT-bioautografi

Konsentrasi (ppm)	Logaritma Konsentrasi (x)	Diameter zona hambat Oksitetrasiklin (cm) (y)
100,8	2,0035	1,7300
201,6	2,3045	1,9200
302,4	2,4806	2,1350
403,2	2,6055	2,2225
504,0	2,7024	2,3200
Persamaan garis regresi		$y = 0,8573x - 7,5901.10^{-3}$
Koefisien korelasi (r)		0,9942
Koefisien variasi fungsi (V_{x_0})		1,4303%



Gambar 3. Hasil pengamatan daya hambat pada penetapan parameter linearitas oksitetrasiklin dengan KLT-bioautografi

2. Penentuan Akurasi dan Presisi

Penentuan akurasi dilakukan pada matriks udang yang ditambahkan oksitetrasiklin sebesar $(15 \pm 10\%)$ mg, $(20 \pm 10\%)$ mg, dan $(25 \pm 10\%)$ mg, masing-masing dilakukan dengan tiga kali ulangan. Hasil uji KLT-bioautografi untuk penentuan parameter akurasi dan presisi memberikan data rata-rata perolehan kembali (*recovery*) sebesar $59,7287\% \pm 2,9133$ dengan koefisien variasi (KV) sebesar 4,8775% (Tabel 5 dan Gambar 4).



Gambar 4. Hasil pengamatan daya hambat pada penetapan parameter akurasi dari sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin dengan KLT-bioautografi

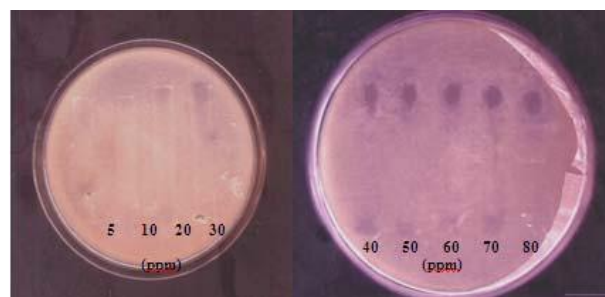
Penotolan ekstrak matriks yang mengandung oksitetrasiklin pada berbagai konsentrasi dilakukan dalam satu lempeng KLT dengan seri linieritas, sehingga diperoleh kondisi yang sama antara seri linieritas dengan akurasi, dengan harapan agar data yang dihasilkan lebih valid, baik untuk metode KLT-Bioautografi maupun metode KLT-Densitometri.

Tabel 5. Hasil perhitungan parameter akurasi dari sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin dengan KLT-bioautografi

Sampel	Diameter zona hambat (cm)	Kadar yang Ditambah (mg)	Kadar yang didapat (mg)	rekoveri (%)
1	19,025	14,67	81,147	553,146
	19,100	14,55	82,789	568,993
	19,100	14,37	86,248	600,194
2	20,350	19,60	120,662	615,622
	20,400	19,48	122,284	627,742
	20,400	19,48	122,284	627,742
3	21,250	24,75	147,493	595,929
	21,350	24,10	151,520	626,116
	21,000	24,50	137,934	562,994
Rata-rata (%)				597,287
Standar Deviasi (SD)				29,133
Koefisien Variasi (KV)				48775%

3. Penentuan Batas Deteksi

Hasil pengamatan untuk parameter Batas deteksi oksitetrasiklin pada matriks udang dengan KLT-bioautografi dapat diperoleh dari harga KHM.



Gambar 5. Hasil pengamatan daya hambat pada penetapan parameter batas deteksi dari sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin (5-80 ppm) dengan KLT-bioautografi

Pada konsentrasi 20,04 ppm atau setara dengan 0,2004 μg , oksitetrasiklin mulai menunjukkan hambatan terhadap bakteri uji (Gambar 5 dan Tabel 6).

Tabel 6. Hasil perhitungan parameter batas deteksi oksitetrasiklin dalam matriks udang dengan KLT-bioautografi

Konsentrasi (ppm)	Diameter zona hambat Oksitetrasiklin (cm)
5,01	-
10,02	-
20,04	0,5150
30,06	0,7100
40,08	0,7200
50,10	0,7450
60,12	0,8100
70,14	0,9400
80,16	1,0250

4. Penentuan Batas Kuantitasi

Batas kuantitasi menunjukkan kuantitas terkecil analit yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas kuantitasi ditetapkan sebagai tiga kali harga batas deteksi (Tiryaki, 2006). Untuk mendapatkan harga batas kuantitasi, terlebih dahulu dilakukan penentuan koefisien korelasi (r) antara logaritma konsentrasi (x) dengan diameter zona hambat (y) antibiotik (Tabel 7 dan Tabel 8).

Tabel 7. Hasil uji KLT-bioautografi larutan oksitetrasiklin pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Diameter zona hambat Oksitetrasiklin (cm) (y)	Log konsentrasi (x)
20,04	0,5150	1,3019
30,06	0,7100	1,4780
40,08	0,7200	1,6030
50,10	0,7450	1,6998
60,12	0,8100	1,7790
70,14	0,9400	1,8460
80,16	1,0250	1,9040
100,20	1,4050	2,0009
200,40	1,6250	2,3019

Berdasarkan hasil perhitungan dapat disimpulkan bahwa batas kuantitasi untuk oksitetrasiklin dalam matriks udang adalah 50,10 ppm dengan nilai r yang memenuhi persyaratan, yaitu lebih besar dari 0,950 (Riduwan, 2009).

Tabel 8. Hasil perhitungan koefisien korelasi (r) pada beberapa seri konsentrasi oksitetrasiklin

Konsentrasi oksitetrasiklin (ppm)	r
20,04; 30,06; 40,08; 50,10; 60,12	0,9388
30,06; 40,08; 50,10; 60,12; 70,14	0,8614
40,08; 50,10; 60,12; 70,14; 80,16	0,9493
50,10; 60,12; 70,14; 80,16; 100,2	0,9557

Validasi Metode KLT-Densitometri

1. Penentuan Linieritas

Penentuan parameter validasi linearitas ditetapkan dengan cara menotolkan lima macam konsentrasi standar oksitetrasiklin pada lempeng KLT. Bersamaan dengan penetapan parameter linieritas, dilakukan akurasi dan presisi sampel. Hal ini bertujuan agar area yang dihasilkan oleh sampel masih dapat memasuki rentang linieritas yang digunakan, sehingga diharapkan data yang diperoleh dapat lebih valid. Hasil perhitungan mengacu data Tabel 9 menunjukkan bahwa parameter linearitas

oksitetrasiklin memenuhi persyaratan parameter validasi dengan nilai r hitung > r Tabel, yaitu 0,950 (Riduwan, 2009).

Tabel 9. Hasil perhitungan parameter linieritas oksitetrasiklin dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (ppm)	C dalam 10 µL (µg) (x)	Area Oksitetrasiklin (y)
100,8	1,0080	9704,59
201,6	2,0160	18429,05
302,4	3,0240	26088,37
403,2	4,0320	36541,61
504,0	5,0400	51008,54
Persamaan garis regresi		$y = 9992,1091x - 1861,706$
Koefisien korelasi (r)		0,9916
Koefisien variasi fungsi (V_{x_0})		7,9332%

2. Penentuan Akurasi dan Presisi

Penentuan akurasi dilakukan dengan cara yang sama pada metode KLT-bioautografi, hanya untuk pengamatan dilakukan dengan densitometer.

Tabel 10. Hasil perhitungan parameter akurasi dari sampel udang yang mengandung oksitetrasiklin dengan KLT-densitometri

Sampel	Area	Kadar Oksitetrasiklin adisi (mg)	Kadar yang didapat (mg)	% rekoverti
1	22142,20	14,67	10,1485	69,1786
	19873,19	14,55	9,0130	61,9450
	19046,30	14,37	8,5990	59,8399
2	25342,60	19,60	11,7495	59,9464
	24420,88	19,48	11,2885	57,5944
	24903,36	19,44	11,5300	59,3107
3	29914,74	24,75	14,0375	56,7172
	33497,58	24,10	15,8305	65,6867
	33924,05	24,50	16,0440	65,8399
Rata-rata (%)				61,7843
Standar Deviasi (SD)				4,2262
Koefisien Variasi (KV)				6,8402%

Berdasarkan perhitungan menggunakan data pada Tabel 10, diperoleh rata-rata perolehan kembali

(recovery) sebesar 61,7843% \pm 4,2262 dengan koefisien variasi (KV) sebesar 6,8402%.

3. Penentuan Batas Deteksi

Berdasarkan hasil perhitungan Batas deteksi menggunakan data yang tersaji pada Tabel 11, didapatkan SD untuk oksitetrasiklin adalah 814,5573, sehingga dari hasil perhitungan didapatkan Batas Deteksi = 12,10 ppm atau setara dengan 0,1201 μ g oksitetrasiklin dan Batas kuantitasi = 40,35 ppm.

Tabel 11 Hasil perhitungan parameter batas deteksi oksitetrasiklin dalam matriks udang dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam 10 μ L (μ g) (x)	Area Oksitetrasiklin (y)
40,08	0,4008	7277,65
50,10	0,5010	9139,59
60,12	0,6012	11679,72
80,16	0,8016	16678,93
100,20	1,0020	18863,49
Persamaan garis regresi		$y = 20189,4926x - 623,8392$
Koefisien korelasi (r)		0,9897
SD		814,5573

Analisis Data Secara Statistik

Data yang diperoleh pada Tabel 5 dan 10 dianalisa dengan Uji t berpasangan (*paired t test*), menghasilkan data tersaji pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil uji t persen perolehan kembali oksitetrasiklin dalam udang dengan metode KLT Densitometri dan KLT-Bioautografi

Hasil <i>paired t-test</i> Oksitetrasiklin	
Df	8
Sig. (2-tailed)	0,363
t hitung	0,964

Harga P untuk oksitetrasiklin = 0,363 dengan $\alpha = 0,05$. Harga t hitung yang diperoleh lebih kecil daripada t tabel, yakni $0,964 < 2,306$. Tidak terdapat perbedaan akurasi yang bermakna antara metode KLT-Densitometri dan KLT-Bioautografi untuk analisis oksitetrasiklin dalam matriks udang.

KESIMPULAN

Parameter linieritas, limit deteksi, dan limit kuantitasi yang diperoleh dengan metode KLT-Densitometri dan KLT-Bioautografi pada penelitian ini telah memenuhi persyaratan validasi untuk penetapan kadar oksitetrasiklin dalam matriks udang. Kedua metode tidak memenuhi persyaratan berdasarkan parameter akurasi. Parameter presisi untuk metode KLT-Bioautografi telah memenuhi persyaratan, sedangkan KLT-Densitometri tidak memenuhi persyaratan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2009. **The United States Pharmacopeia. Pharmacist Pharmacopoeia**, second edition, The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. p. 2149-2154
- Aranda, M., Cisternas, E., Villegas, R., 2006. Determination of Oxytetracycline in Honey by Ion-Pair HPLC with Cationic-SPE. **Electronic Journal of Food and Plants Chemistry** 1, Vol.1, p. 12-15
- Choma, I., 2005. **The Use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis**. M. Curie Slodowska University, Poland, p. 13-15
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014. **Farmakope Indonesia. Edisi ke-5**, Jakarta: Departemen Kesehatan, hal 780, 980
- Hadi, S., 2000. **Statistik, Jilid 2**, Yogyakarta: Penerbit Andi, hal 288
- Harmita, 2004, **Majalah Ilmu Kefarmasian**, Vol.1, No. 3: Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, Departemen FMIPA-UI, Indonesia, p. 117-135
- Puradewa, Levi., 2006, **Validasi Metode Analisis Residu Antibiotika Oksitetrasiklin dan Tetrasiiklin pada Udang Secara HPLC**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, p. 54-55
- Ramirez, A., Gutierrez, R., Diaz, G., Gonzalez C., Perez, N., Vega, S., Noa., M. 2002. High-Performance Thin-Layer Chromatography-Bioautography for Multiple Antibiotic Residues in Cow's Milk. **Journal of Chromatography B**, Vol. 784, p. 315-322
- Ratnasari, D.P., 2009, **Validasi Metode Bioautografi untuk Penentuan Campuran Tetrasiiklin dan Oksitetrasiklin**. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

- Riduwan, M.B.A., dan Sunarto, M.Si., 2009, **Pengantar Statistika Untuk Penelitian Pendidikan, Sosial, Ekonomi, Komunikasi, dan Bisnis**, Bandung: Alfabeta, p. 359-360.
- Skoog, D.A., 1998, **Principles of Instrumental Analysis**, 5th ed., Harcourt Bruce and Company, USA, p. 675-695
- Tiryaki, O., 2006. Method Validation for The Analysis of Pesticide Residues in Grain by Thin Layer Chromatography. **Accred Qual Assur**, Vol. 11 p. 506-513.
- Yuwono, M., Indrayanto, G., 2005. **Oxytetracycline: Analytical Profile . Profile of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, Vol. 32, p. 97-115