

Pengembangan Metode Analisis Antibiotik Tetrasiklin dalam Hati Ayam Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Kckt)

¹Mas Ayuning Putri, ²Diar Herawati, ³Nety Kurniaty

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas MIPA, Unisba, Jl. Tamansari No. 1 Bandung 40116

e-mail: ¹putri_266@yahoo.co.id, ²diarmunawar@gmail.com,

³Netykurniaty@yahoo.com

Abstract : Tetracycline is an antibiotic which is widely used on chicken farm as medicine as well additives to spur growth. The maximum residue limits of tetracycline antibiotic in livestock product based on the Indonesia National Standard in 2001 is 0,600 ppm for liver. This study of chicken liver has tested three samples of chicken liver from one region. Samples were first prepared using 20% trichloroacetic acid and a citrate buffer at pH 4 as solvent, followed by centrifugation technique at 2000 rpm for 20 minutes. After that, liquid-liquid phase extraction is done using n-hexane and then the samples are purified by solid phase extraction (SPE). The eluents of SPE were methanol, distilled water, 5% methanol and oxalic acid-contained methanol. Further the samples are analyzed with HPLC using ODS (octadecyl silica) column. Elution is done by isocratic type and mobile phase used were methanol and a solvent mixture (oxalic acid : acetonitrile 4:1), 90:10 flow rate of 1 mL/minutes, using UV detector in a wave length of 355 nm. The result of the analysis shows that the levels of tetracycline in sample A is 0,322 ppm, 0,433 ppm for the sample B, sample C is 0,316 ppm. The results are validated where the value of accuracy is 58,3%, precision is 0,123%, the limit of detection is 0,0654, and the limit of quantification 0,218 ppm.

Keywords : Chicken liver, HPLC, SPE, tetracycline.

Abstrak : Tetrasiklin merupakan golongan antibiotik yang banyak digunakan oleh peternak ayam sebagai obat maupun tambahan pakan untuk memacu pertumbuhan (feed additive). Batas Maksimum Residu (BMR) tetrasiklin dalam produk ternak berdasarkan Standar Nasional Indonesia Tahun 2001 adalah 0,6000 ppm untuk hati. Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap tiga sampel hati ayam yang beredar di pasaran. Sampel hati ayam dipreparasi terlebih dahulu menggunakan pelarut trikloroasetat 20% dan buffer sitrat pH 4, kemudian dilanjutkan dengan teknik sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit, dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan n-heksan dan dimurnikan menggunakan SPE. Eluen SPE yang digunakan metanol, aquades, metanol 5% dan metanol oksalat. Selanjutnya sampel dianalisis menggunakan KCKT kolom ODS (oktadesil silika), elusi dilakukan dengan cara isokratik dan fase gerak yang digunakan adalah campuran asam oksalat-asetonitril(4:1) dan metanol dengan perbandingan elusi 90 : 10 laju alir 1 mL/menit. Menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 355 nm. Hasil analisis menunjukkan kadar tetrasiklin dalam sampel A 0,322 ppm, B 0,433 ppm, dan C 0,316 ppm. Hasil tersebut tervalidasi dengan nilai akurasi 58,3%, presisi 0,123%, batas deteksi 0,0654, dan batas kuantifikasi 0,218 ppm.

Kata Kunci: Hati Ayam, Tetrasiklin, SPE, KCKT.

A. Pendahuluan

Hati merupakan salah satu organ penting dalam tubuh. Organ ini penting untuk sekresi empedu, detoksifikasi atau degradasi zat sisa hormon serta obat dan senyawa asing lainnya. Namun hati mempunyai banyak tempat pengikatan senyawa-senyawa yang tidak bisa detoksifikasi sehingga menyebabkan kadar residu obat dalam hati menjadi lebih tinggi dibandingkan kadar residu dalam jaringan lain (Lu, 1995; Doull, 1996).

Beberapa antibiotik bisa digunakan dalam pakan ternak sebagai pencegahan, pengobatan penyakit dan tambahan pakan (feed additives). Salah satu antibiotik yang

sering digunakan pada pakan ternak ayam adalah tetrasiklin. Penggunaan tetrasiklin yang berlebihan, akan menimbulkan residu pada produk ternak. Residu antibiotik dalam tubuh manusia yang berasal dari hewan ternak dapat menimbulkan resistensi karena jumlah subterapeutik yang diterima secara terus menerus, serta gangguan terhadap mikroflora normal dalam usus, yang dapat mengurangi populasi maupun mengeliminasi strain-strain bakteri yang bermanfaat (Lee *et al.*, 2000).

Pemberian antibiotik pada hewan dalam peternakan skala besar umumnya diberikan melalui air minum dan dapat diikuti dengan pemberian antibiotik melalui pakan (Martaleni, 2007). Hampir semua pabrik pakan menambahkan obat hewan berupa antibiotik ke dalam ransum jadi (Bahri *et al.*, 2000).

Apabila peternak yang menggunakan pakan tersebut tidak memperhatikan aturan pemakaiannya, maka produk ternak tersebut dapat mengandung residu antibiotik yang dapat membahayakan kesehatan manusia (Yuningsih, 2005).

Acuan Pemerintah dalam penerapan Standar Nasional Indonesia Tahun 2000 No.D1-6366-2000, batas minimal residu dan obat antibiotik pada bahan makanan asal hewan, antara lain untuk tetrasiklin pada daging 0,1 ppm, telur 0,05 ppm dan susu 0,05 ppm. Batas Maksimum Residu (BMR) dalam produk unggas berdasarkan Standar Nasional Indonesia untuk hati adalah 0,600 ppm (SNI, 2001).

Pada penelitian sebelumnya telah diperoleh informasi bahwa pada sampel hati ayam terindikasi adanya antibiotik tetrasiklin (Perdian, 2015). Tetapi penelitian ini belum memberikan hasil analisis kuantitatif yang tervalidasi. Maka diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis kadar tetrasiklin dalam hati ayam serta perlu dilakukan pengembangan metode analisis tetrasiklin dalam hati ayam secara kuantitatif. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi masyarakat tentang kadar tetrasiklin dalam hati ayam. Analisis dilakukan dengan menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

B. Landasan Teori

Tetrasiklin adalah antibiotik bakteriostatik berspektrum luas yang menghambat sintesis protein. Tetrasiklin bekerja aktif terhadap banyaknya bakteri Gram positif dan Gram negatif, termasuk bakteri anaerob, riketsia, klamidia, mikroplasma, bentuk L, dan terdapat beberapa protozoa, misalnya amoeba.

Tetrasiklin bekerja dengan menghalangi penambahan asam amino baru pada rantai peptida yang sedang terbentuk, biasanya bersifat menghambat atau membunuh bakteri Gram positif dan Gram negatif (Jawetz, E. 1996) atau baik pada mikroba ekstrasel mampu intrasel, tipe kerjanya bakteriostatik. Mekanisme kerjanya yaitu hambatan pada sintesis protein ribosom dengan menghambat pemasukkan aminoasil t-RNA pada fase pemanjangan yang termasuk fase translasi ini akan menyebabkan blokade perpanjangan rantai peptida (Mutschler, 2006:650-651).

Berdasarkan proses farmakokinetiknya, tetrasiklin mampu diabsorpsi sebanyak 30-80% melalui saluran cerna, namun proses absorpsi ini sebagian belangsung di lambung dan usus halus bagian atas. Sebagian besar golongan tetrasiklin dalam darah terikat pada protein plasma dalam jumlah yang bervariasi, dan mampu terakumulasi dalam hati, jaringan limpa, sumsum tulang, area dentin dan email gigi serat dapat melewati sawar urin. Pengeluaran atau proses eliminasi tetrasiklin terjadi di ginjal melalui mekanisme filtrasi glomerulus dan dikeluarkan melalui urin (Setiabudi, 2011:695-696).

Terjadinya residu dalam tubuh hewan itu disebabkan ketika kurangnya informasi mengenai penambahan imbuhan pakan secara langsung sehingga mengakibatkan ketidaktahuan peternak dan ketidakpatuhan para peternak dalam penggunaan obat antibiotik yang diberikan dengan cara menambahkan pada pakan sehingga kurang memperhatikan waktu henti obat (Brady dan Katz, 1992).

Metode penelitian kadar tetrasiklin dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan alat instrumen kromatografi cair kinerja tinggi. Sampel hati ayam yang digunakan yaitu hati ayam yang beredar di pasar tradisional di Bandung.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Sampel hati ayam yang sudah diblender ditambahkan larutan asam trikloroasetat 20 % dan buffer sitrat pH 4 selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi cair-cair dengan pelarut n-heksan. Kemudian dilakukan proses penguapan menggunakan waterbath selama 20 menit dengan suhu 70°C. Dilakukan pemurnian menggunakan kolom *solid phase extraction (SPE)* dengan mengalirkan 10 mL metanol, kemudian ditambahkan aquades 10mL. Tahap retensi dilakukan dengan memasukkan sampel kedalam kolom SPE. Tahap pembilasan digunakan metanol 5% sebanyak 10 mL. Tahap terakhir yaitu elusi digunakan metanol oksalat sebanyak 6 mL. Hasil dari sampel elusi yang menggunakan metanol oksalat diambil 1 ml kemudian diencerkan untuk keperluan analisis KCKT pada labu takar 10 ml hingga tanda batas setelah itu dilakukan penyaringan dua kali menggunakan membran Filtrae 0,45µm Agilent. Selesai disaring larutan tersebut dipindahkan ke vial dan kemudian siap di injeksikan atau dianalisis dengan KCKT dengan fase gerak campuran asam oksalat-asetonitril (4:1) dan metanol dengan perbandingan elusi 10 : 90 laju alir 1 mL/menit. Menggunakan kolom oktadesil silika (ODS) elusi dilakukan dengan cara isokratik dan menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 355nm.

Hasil kromatogram yang diperoleh dari larutan standar tetrasiklin pada konsentrasi 10 ppm waktu retensi 2,127 menit elusi dilakukan selama 5 menit, dimana alat KCKT dapat mendeteksi senyawa tetrasiklin. Sampel A,B (hati ayam boiler) dan sampel C (hati ayam kampung) menghasilkan waktu retensi yang mendekati waktu retensi larutan standar jadi dapat disimpulkan secara kualitatif dan kuantitatif bahwa sampel hati ayam positif mengandung residu antibiotik tetrasiklin dapat dilihat pada table dibawah ini.

Nama	Waktu Retensi	Luas Area	Hasil Analisis Kualitatif	Hasil Kadar Kuantitatif (ppm)
Standar	2,127	5205347	-	-
Sampel A boiler	2,117	200360	Terdeteksi	0,322
Sampel B boiler	2,117	259371	Terdeteksi	0,433
Sampel C Kampung	2,147	196943	Terdeteksi	0,316

Tabel IV.1. Hasil Identifikasi dalam sampel

Tujuan dilakukan uji kesesuaian sistem adalah untuk melihat sistem kromatogram dapat beroperasi secara baik atau tidak. Dimana dilakukan penyuntikan sebanyak 7 kali dengan larutan standar tetrasiklin pada konsentrasi 10 ppm dengan alat KCKT pada kondisi optimum. Dari kromatogram yang diperoleh dapat dilihat nilai luas area dan waktu retensi, sehingga nilai simpangan baku residual (SBR) dapat dihitung dengan diperoleh luas area 0,717 % dengan waktu retensi 0,157 %. Hasil tersebut memenuhi syarat, karena nilai SBR yang memenuhi syarat yang baik adalah $\leq 2\%$.

Penyuntikan Ke-	Luas Area (AUC)	Rata-rata
1	69368606	
2	70131658	
3	70233395	
4	70467603	70343797
5	70561903	
6	70800856	
7	70842560	

Tabel IV.2. Uji Kesesuaian Sistem Luas Area

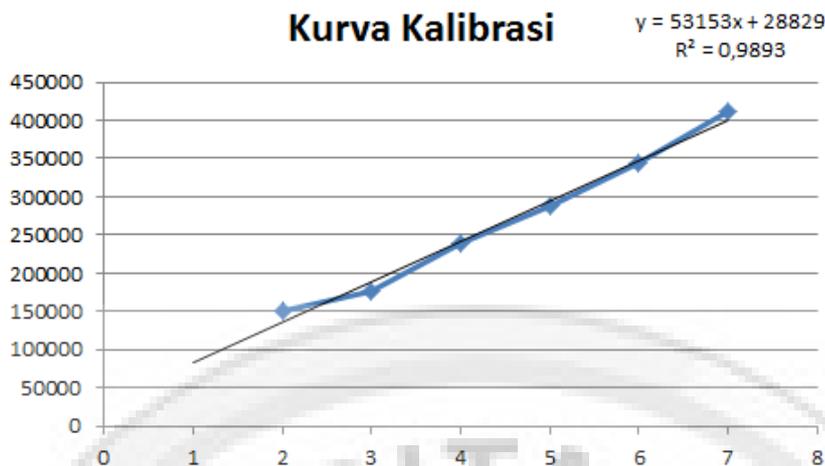
Penyuntikan Ke-	Waktu Retensi	Rata-rata
1	2,127	
2	2,123	
3	2,130	
4	2,123	2,125
5	2,123	
6	2,130	
7	2,123	

Tabel IV.3. Uji Kesesuaian Sistem Waktu Retensi

Uji linieritas bertujuan untuk memperoleh hasil uji yang proporsional (sepadan) terhadap konsentrasi analit dalam sampel dan dalam rentang konsentrasi yang digunakan secara langsung atau melalui suatu transformasi matematika yang jelas. Sehingga untuk mengetahui apakah dua variabel mempunyai hubungan yang linier atau tidak secara signifikan. Setelah dibuat persamaan garis lurus (regresi linier) $y = a + bx$ dimana nilai $a = 28829$ dan nilai $b = 531527$ dengan nilai koefisien korelasi atau disebut juga sebagai nilai $(r) = 0,989$ dan $V_{x_0} 0,048 \%$. Data yang diperoleh dapat disimpulkan memenuhi syarat karena nilai koefisien korelasi mendekati nilai 1, sedangkan V_{X_0} memenuhi syarat karena tidak melebihi dari 5 %.

Tabel IV.5. Linieritas

C ppm	Luas Area	\hat{y}	$y - \hat{y}$	$(y - \hat{y})^2$
0,2	149916	135134,4	14781,6	218495698,6
0,3	176236	188287,1	-12051,1	145229011,2
0,4	238698	241439,8	-2741,8	7517467,24
0,5	287286	294592,5	-7306,5	53384942,25
0,6	344887	347745,2	-2858,2	8169307,24
0,7	411077	400897,9	10179,1	103614076,8
Rata-rata	0,45		$\Sigma =$	536410503,3
			Rata-rata	72152193,5
			S_{y/x}	11.580,269
			S_{x₀}	0,0217
			V_{x₀}	0,0482



Gambar 1 Kurva linieritas

Akurasi merupakan kecermatan tingkat kedekatan hasil pengujian metode dengan nilai yang sebenarnya atau nilai yang dinyatakan benar. Dari hasil akurasi yang diperoleh nilai persen perolehan kembali dari konsentrasi sebesar 0,5 ppm diperoleh sebesar 58,3%. Dari data yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa nilai perolehan kembali tidak memenuhi persyaratan atau tidak memberi penguatan karena jumlah kadarnya yang kecil disebabkan belum sempurnanya pemisahan komponen-komponen sehingga nilai yang diperoleh tidak masuk dalam rentang syarat akurasi yaitu 98-102%.

Tabel IV. 6. Akurasi

C (PPM)	Lar. Sampel + Baku	Lar. Sampel	(Lar . Sampel + Baku) - (Lar Baku)	Kadar (X)	% Rec	Rata-rata
0,5	378821	200360	178461	0,286	57,2	58,3%
0,5	399676	200360	199316	0,320	64	
0,5	367965	200360	167605	0,269	53,8	

Dari hasil presisi pada konsentrasi 0,5 ppm didapat SBR 0,123 % dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa SBR memenuhi syarat karena SBR yang baik adalah $\leq 5\%$.

C (PPM)	Kadar (X)	(X - Xrata-rata)	(X - X rata-rata) ²
0,5	0,286	-0,004	0,000016
	0,320	0,03	0,0009
	0,269	-0,021	0,000441
	0,262	-0,028	0,000784
	0,306	0,016	0,000256
	0,301	0,011	0,000121
Rata-rata	0,290	Jumlah	0,0002518
		Rata-rata	0,000419
		SD	0,000358

Tabel IV.7. Hasil simpangan baku relatif pada presisi

D. Kesimpulan

Berdasarkan pengembangan metode yang dilakukan hasil analisis menunjukkan sampel A, B, dan C terdeteksi positif mengandung tetrasiklin dan dugaan sementara

mengandung turunan tetrasiklin. Kadar yang diperoleh dari sampel A adalah 0,322 ppm, sampel B adalah 0,433 ppm dan sampel C adalah 0,316 ppm. Untuk hasil validasi didapat nilai akurasi 58,3%, nilai yang diperoleh masih kecil dikarenakan pada saat preparasi sampel belum begitu baik dan masih terdapat banyaknya puncak-puncak yang belum sempurna terpisah, sedangkan untuk nilai presisi 0,123, LOD 0,0654 ppm dan nilai LOQ 0,218 ppm telah memenuhi persyaratan.

Daftar Pustaka

- Badan Standarisasi Nasional. SNI No: 01-6366-2000. Batas Maksimum Residu Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan. Jakarta.
- Bahri, S., A. Kusumaningsih, T.B. Murdiati, A. Nurhadi, dan E. Masbulan. 2000. Analisis Kebijakan Keamanan Pangan Asal Ternak (Terutama Ayam Ras Petelur dan Broiler). Laporan Penelitian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor.
- Brady, Ms. Dan Katz, SE. 1992. *Analisis Of Antibiotik Drud Residu in food product Of animals Origin*, Edited By V.K. Agarwal. 5-7. Pleneum Press New York.
- Chopra, I., & Roberts, M.(2001). "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molevular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance". *Microbiology and Moleculer Biology Review*. 65,(2), 2232-260.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, Farmakope Indonesia, Edisi IV, Jakarta, 778.
- Doull's, C. 1996. *Toxycology The Basis Science of poisons Curtis D. Klaaseen (Ed). Fifth Edition. Health Profesion Division. Mc. GrawHill. New York.*
- Frank, C. Lu. 1995. Toksikologi Dasar Asas, Organ sasaran dan Penilaian Risiko. Edisi kedua . Penerjemah Edi Nugroho. UI Press Jakarta.
- Gandjar I.G. dan Rohman A. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Golib, Ibnu dan Rahman Abdul, Kimia Farmasi Analisis. Jakarta: Pustaka Pelajar, 2011.
- Jawetz, E.et al. 1996. Mikrobiologi Klinik. Jakarta: Penerbit Buku kedokteran EGC.
- Jensen, Robert G. 1995. Handbook of Milk Composition. Academic Press. United States of America.
- Landhanie, UU. 2005. Karakteristik Reproduksi Kerbau Rawa Dalam Kondisi Lingkungan Peternakan Rakyat. *Bioscientiae*, 2.(1) <http://bioscientiae.tripod.com>.
- Lu, F.C. 1995. Toksikologi Dasar. Asas, Organ sasaran, dan Penelitian Risiko. Edisi Kedua. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Martaleni. 2007. Deteksi residu antibiotik pada karkas, organ, dan kaki ayam pedagingan yang diperoleh dari pasartradisional Kabupaten Tangerang [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Mutschler, Ernst. Dinamika Obat edisi 5. Bandung. ITB, 2006.

- Oramahi, R., Yudhabuntara, D., Budiharta, S. (2004). Kajian Residu Antibiotik Pada Hati Ayam di Kota Yogyakarta. Tesis. Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Hal. 287-291.
- Oramahi, R., D. Yudhabuntara dan S. Budiharta 2005. Kajian Residu Antibiotic Pada Hati Ayam Di Kota Yogyakarta. Tesis. Program Studi Sain Veteriner, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Perdian, Ari hendi. (2015). Analisis Residu Golongan Tetrasiklin Pada Ayam Dikawasan Cobleng Kota Bandung Dengan Metode Kromatogram Cair Kinerja Tinggi [SKRIPSI], Program Studi Farmasi Fakultas Matematika Dan Pengetahuan Alam Universitas Islam Bandung.
- Rahayu ID.2010. Prinsip pengobatan pada ternak. <http://imbang.staf.umm.ac.id>.
- Resnawati, H. 2005. Preferensi Konsumen terhadap daging dada ayam pedaging yang diberi ransum menggunakan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Balai Penelitian Ternak, Bogor. Hlm 744-748.
- Resnawati, H. dan I.A.K. Bintang. 2005. Kebutuhan pakan ayam kampung pada periode pertumbuhan. hlm. 138-141. Prosiding Lokakarya Nasional Inovasi Teknologi Pengembangan Ayam Lokal, Semarang, 26 Agustus 2005. Kerjasama Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan dengan Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang.
- Rohman, A. 2007, Kimia Farmasi Analisis, Penerbit: Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Setiabudi. Rianto. 2011, Farmakologi dan Terapi Edisi 5, Jakarta : Badan Penerbit FKUI.
- Subronto dan Tjahajati,I. 2001. Ilmu Penyakit Ternak II. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sukma, I.W.D., 2012, Ekstraksi Cair-cair, Laporan Penelitian, Universitas Lampung, Lampung.
- SK Dirjen Peternakan No. 17 Tahun 1983.
- Voigt, R., 1995, Buku Pelajar Teknologi Farmasi. (Terjemahan S. Noerono). Gajah Mada Universitas Press, Yogyakarta, 442-456.
- Wattimena, 1991, *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta. (195-197).
- Watson, D.G. (2009). *Analisis Farmasi*, Edisi 2, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Yuningsih. 2005. Keberadaan *residu antibiotik dalam produk peternakan (susu dan daging)* [Makalah]. Di dalam: Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan. Bogor. Balai Penelitian Veteriner.
- Yuningsih. 2004. Keberadaan *residu antibiotik dalam produk peternakan (susu dan daging)*. Di Dalam: Lokakarya Nasional keamanan Pangan Produk Peternakan. Bogor: Balai Penelitian Veteriner. Halm 48-55.