

Jurnal Ilmiah  
**FARMASI**

(Scientific Journal of Pharmacy)



**JURNAL ILMIAH FARMASI**  
(SCIENTIFIC JOURNAL OF PHARMACY)

**PIMPINAN UMUM/ PENANGGUNG JAWAB**  
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia

**WAKIL PIMPINAN UMUM/ WAKIL PENANGGUNG JAWAB**  
Ketua Jurusan Farmasi FMIPA UII

**MITRA BESTARI**

1. Prof. Dr. Wiryatun Lestariana, Apt
2. Prof. Dr. Zullies Ikawati, Apt
3. Prof. Dr. Sudibyo Martono, Apt
4. Dr. Tedjo Yuwono, Apt
5. Prof. Dr. Dachriyanus, Apt
6. Prof. dr. Iwan Dwiprahasto, MMedSc, PhD
7. Prof. Dr. Lukman Hakim M.Sc., Apt
8. Prof. Dr. Achmad Fudholi, DEA, Apt
9. Prof. Dr. Ibnu Gholib Gandjar, DEA., Apt

**DEWAN EDITOR**

Ketua : Saepudin, M.Si., Apt  
Sekretaris : Rochmy Istikharah, M.Sc., Apt  
Anggota : Vitarani Dwi Ananda Ningrum, M.Si., Apt  
Okti R. Mafruhah, MSc., Apt  
Dimas Adhi Pradana, MSc., Apt.  
Fithria DA. Suryanegara, MSc., Apt.  
Ari Wibowo, S.Farm., Apt  
Arba Pramudita Ramadani, MSc., Apt.  
Oktavia Indrati, S.Farm., Apt.

**Penerbit**

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia

**Alamat Penerbit**

Jurusan Farmasi FMIPA UII  
Jl. Kaliurang Km. 14,4 Yogyakarta 55584  
Telp. (0274) 896439 ext. 3047  
Email: jif@uii.ac.id

# ANALISIS RESIDU ANTIBIOTIK Kloramfenikol DALAM DAGING IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*, Lac) MENGGUNAKAN METODE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ari Wibowo<sup>\*</sup>, Lukysanita Muliana, M. Hatta Prabowo

Jurusan Farmasi Fakultas MIPA, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

\*e-mail: ari.wibowo@uii.ac.id

## ABSTRAK

Penggunaan kloramfenikol (CAP) pada hewan produksi untuk tujuan non-terapeutik berpotensi menimbulkan akumulasi residu CAP pada jaringan dan organ hewan tersebut. Manusia yang mengkonsumsi produk ternak yang mengandung residu CAP dapat berdampak buruk bagi kesehatannya, karena berpotensi menimbulkan reaksi hipersensitivitas, deperesi sumsum tulang belakang (anemia aplastik), bahkan resistensi CAP pada manusia. Komoditi perikanan yang sering menggunakan antibiotik untuk meningkatkan produksinya adalah ikan gurami (*Osphronemus gouramy*, Lac). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kadar residu antibiotik CAP dalam daging ikan gurami dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), kemudian kadar yang diperoleh dibandingkan dengan BMR (Batas Maksimum Residu) antibiotik pada bahan makanan asal hewan (SNI 01-6366-2000). Kurva kalibrasi menunjukkan linieritas yang baik pada range 5 – 40 ng/ml ( $r = 0,9995$ ). Hasil penelitian menunjukkan ikan gurami yang dijual di ketiga pasar tradisional yaitu sebesar 0,276; 0,281; 1,168 ng/g. Kadar residu CAP yang diperoleh tidak melebihi BMR berdasarkan batasan pada Standar Nasional Indonesia (0,01 mg/kg), namun kadar CAP dari salah satu pasar tidak memenuhi persyaratan oleh *European Union* (0,3 µg/kg).

Kata kunci: HPLC, ikan gurami (*Osphronemus gouramy*, Lac.), residu kloramfenikol (CAP)

## ABSTRACT

The use of antibiotic in food animals is not only for therapeutic purposes, but also for non-therapeutic purposes. The use of antibiotic for non-therapeutic purposes is done by adding antibiotic to feed (food additives) that is aimed as growth promoter to improve livestock production. Antibiotic which is often used in animals as a growth factor is chloramphenicol (CAP). The use of antibiotic in farm animals for non-therapeutic purpose has potency to generate accumulation of antibiotic residues in tissues and organs of these animals. Humans who consume animal products that contain antibiotic residues may cause adverse effects to health, because it can cause allergic reaction, irreversible type bone marrow depression that can lead aplastic anemia, and even CAP resistance in humans. Fishery product which frequently uses antibiotic to increase its production is gourami (*Osphronemus gouramy*, Lac). This study has a purpose to analyze the level of antibiotic residues in gourami using HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) method, then its concentration will be compared with the MRL (Maximum Residue Limits) antibiotic in foodstuffs of animal origin listed in Indonesian National Standards (SNI) No. 01-6366-2000. The calibration curve showed a good linearity in the concentration range from 5 to 40 ng/ml with  $r = 0.9995$ . We found CAP residues in gourami fish sold in the three traditional market were 0.276; 0.281; 1.168 ng/g respectively. This shows that the CAP residues level not exceed the MRL set by SNI (0.01 mg/kg), but it was found one of three levels of CAP did not met the requirements of the *European Union* (0.3 µg/kg).

Keywords: chloramphenicol (CAP) residue, gourami (*Osphronemus gouramy*, Lac.), HPLC

## **ANALISIS RESIDU ANTIBIOTIK Kloramfenikol DALAM DAGING IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*, Lac) MENGGUNAKAN METODE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Ari Wibowo\*, Lukysanita Muliana, M. Hatta Prabowo

Jurusan Farmasi Fakultas MIPA, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

\*e-mail: ari.wibowo@uii.ac.id

### **ABSTRAK**

Penggunaan kloramfenikol (CAP) pada hewan produksi untuk tujuan non-terapeutik berpotensi menimbulkan akumulasi residu CAP pada jaringan dan organ hewan tersebut. Manusia yang mengkonsumsi produk ternak yang mengandung residu CAP dapat berdampak buruk bagi kesehatannya, karena berpotensi menimbulkan reaksi hipersensitivitas, depresi sumsum tulang belakang (anemia aplastik), bahkan resistensi CAP pada manusia. Komoditi perikanan yang sering menggunakan antibiotik untuk meningkatkan produksinya adalah ikan gurami (*Osphronemus gouramy*, Lac). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kadar residu antibiotik CAP dalam daging ikan gurami dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), kemudian kadar yang diperoleh dibandingkan dengan BMR (Batas Maksimum Residu) antibiotik pada bahan makanan asal hewan (SNI 01-6366-2000). Kurva kalibrasi menunjukkan linieritas yang baik pada range 5 – 40 ng/ml ( $r = 0,9995$ ). Hasil penelitian menunjukkan ikan gurami yang dijual di ketiga pasar tradisional yaitu sebesar 0,276; 0,281; 1,168 ng/g. Kadar residu CAP yang diperoleh tidak melebihi BMR berdasarkan batasan pada Standar Nasional Indonesia (0,01 mg/kg), namun kadar CAP dari salah satu pasar tidak memenuhi persyaratan oleh *European Union* (0,3 µg/kg).

Kata kunci: HPLC, ikan gurami (*Osphronemus gouramy*, Lac.), residu kloramfenikol (CAP)

### **ABSTRACT**

The use of antibiotic in food animals is not only for therapeutic purposes, but also for non-therapeutic purposes. The use of antibiotic for non-therapeutic purposes is done by adding antibiotic to feed (food additives) that is aimed as growth promoter to improve livestock production. Antibiotic which is often used in animals as a growth factor is chloramphenicol (CAP). The use of antibiotic in farm animals for non-therapeutic purpose has potency to generate accumulation of antibiotic residues in tissues and organs of these animals. Humans who consume animal products that contain antibiotic residues may cause adverse effects to health, because it can cause allergic reaction, irreversible type bone marrow depression that can lead aplastic anemia, and even CAP resistance in humans. Fishery product which frequently uses antibiotic to increase its production is gourami (*Osphronemus gouramy*, Lac). This study has a purpose to analyze the level of antibiotic residues in gourami using HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) method, then its concentration will be compared with the MRL (Maximum Residue Limits) antibiotic in foodstuffs of animal origin listed in Indonesian National Standards (SNI) No. 01-6366-2000. The calibration curve showed a good linearity in the concentration range from 5 to 40 ng/ml with  $r = 0.9995$ . We found CAP residues in gourami fish sold in the three traditional market were 0.276; 0.281; 1.168 ng/g respectively. This shows that the CAP residues level not exceed the MRL set by SNI (0.01 mg/kg), but it was found one of three levels of CAP did not met the requirements of the *European Union* (0,3 µg/kg).

Keywords: chloramphenicol (CAP) residue, gourami (*Osphronemus gouramy*, Lac.), HPLC

## PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik tidak terbatas hanya ditujukan untuk terapi pada manusia, namun digunakan pula untuk pengobatan pada hewan khususnya hewan ternak. Antibiotik yang sering diberikan pada hewan antara lain kloramfenikol, oksitetrasiklin, penisilin, doksisisiklin, eritromisin, streptomisin, enrofloksasin, dan norfloksasin (Anonim, 1994). Antibiotik untuk tujuan terapi diberikan hanya saat hewan mengalami penyakit infeksi akibat terpapar bakteri tertentu. Penggunaan antibiotik pada hewan ternak ikan hanya direkomendasikan untuk pengobatan induk ikan, tidak dianjurkan untuk ikan-ikan konsumsi dan harus diberikan dalam dosis yang tepat untuk mencegah timbulnya resistensi terhadap bakteri penyebab penyakit ikan tersebut.

Namun kenyataannya antibiotik juga digunakan untuk tujuan non-terapeutik, yakni sebagai pemacu pertumbuhan hewan ternak (*growth promoter*) dengan cara menambahkan antibiotik pada pakan buatan atau sebagai imbuhan pakan (Anonim, 2002a). Penyalahgunaan antibiotik dengan menggunakannya untuk tujuan selain terapeutik tentu memberikan banyak kerugian. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat berpotensi menyebabkan residu dalam jaringan organ hewan ternak. Hal ini tentu cukup berbahaya bagi kesehatan manusia yang mengkonsumsinya, karena dapat menimbulkan reaksi alergi, keracunan bahkan resistensi jika dikonsumsi dalam jumlah besar dan jangka waktu lama (Yuningsih, 1994; Sokolova dan Chemyaev, 2001). Pemakaian antibiotik sebagai imbuhan pakan bertentangan dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) No.7473: 2009 mengenai ketentuan pakan buatan untuk ikan gurami, antibiotik tidak seharusnya terkandung dalam pakan buatan ikan gurami, atau dengan kata lain antibiotik tidak boleh ditambahkan pada pakan buatan (Anonim, 2009a).

Salah satu komoditi perikanan yang sering menggunakan antibiotik untuk meningkatkan produksinya adalah ikan gurami (*Osphronemus gouramy, Lac.*). Ikan gurami digemari masyarakat karena dagingnya yang tebal, memiliki rasa yang gurih dan lezat, mudah dicerna dan bergizi tinggi. Jenis antibiotik yang sering disalahgunakan pemakaiannya pada ikan gurami adalah kloramfenikol (CAP).

CAP merupakan antibiotik spektrum luas yang telah mulai digunakan sejak tahun 1950an untuk pengobatan penyakit pada hewan ternak. Karena risiko yang telah diketahui akibat pemakaian CAP seperti anemia aplastik dan sifat karsinogeniknya, penggunaan CAP sebagai obat pada manusia dan hewan telah dibatasi. Sebagai konsekuensinya *European Community* telah melarang penggunaan CAP pada hewan ternak sejak 1994 (Tamošiūnas *et al.*, 2006). Sedangkan China mulai melarang penggunaan CAP pada budidaya ikan sejak 2002 (Huang *et al.*, 2007).

Meskipun demikian, masih sering ditemukan residu kloramfenikol dalam bahan pangan asal hewan. Umumnya residu antibiotik CAP dalam daging bahan pangan (termasuk ikan gurami) ditemukan dalam jumlah sangat kecil, yaitu dalam kisaran ppb (Anonim, 2000c). Sehingga dibutuhkan metode analisis yang dapat mendeteksi kadar dalam jumlah sekelumit, yaitu dengan metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Belakangan dipersyaratkan bahwa metode yang digunakan harus memiliki nilai *Minimum Required Performance Limit* (MRPL) untuk mendeteksi residu CAP pada bahan pangan asal hewan sebesar 0,3 µg/kg (Tamošiūnas *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Metode analisis menggunakan HPLC ini telah dikembangkan oleh Degroodt *et al.* (1992) dan Badan Standarisasi Nasional (BSN) dalam Standar Nasional Indonesia

(SNI) No. 2354.9:2009 tentang penentuan residu CAP dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan. Metode ini dinilai memiliki efektivitas tinggi, selektivitas, dan sensitivitas yang baik sehingga tepat digunakan untuk menganalisis sampel dalam kadar kecil seperti halnya residu antibiotik. Selain itu, HPLC mampu memisahkan suatu senyawa dari campuran kompleks dengan baik (Gandjar dan Rohman, 2009).

Mengamati masih besarnya potensi penyalahgunaan antibiotik pada produk ternak, serta dampak berbahaya yang ditimbulkan, perlu dilakukan penelitian untuk menentukan tingkat residu antibiotik CAP pada sampel lapang daging ikan gurami di daerah Sleman secara HPLC.

## METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquabides (PT. Ikapharmindo Putramas), etil asetat (kualitas analisis, JT. Baker), n-heksan, etanol, kloroform (kualitas analisis, Merck), baku pembanding CAP (baku produksi 99,69% *Certificate of Analysis*, CoA) yang diperoleh dari PT. Berlico Mulia Farma, metanol (kualitas HPLC, Merck), serta daging ikan gurami segar.

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik (Mettler Toledo AL 204), blender (Miyako BL-101-GS), vortex (Barnstead Thermolyne 16700 mixer), gas nitrogen (kualitas *Gas Chromatography*), seperangkat peralatan gelas (Iwaki Pyrex), sentrifuse (Hitachi himac CT 4D), *ultrasonic bath* (Branson), *wafer bath* (Memmert), kolom C-18 (150 mm x 4,6 mm) 5  $\mu$ m (Waters-Sun Fire), instrumen HPLC (Waters e 2695) yang dilengkapi dengan detektor fotometri (Waters 2489).

### ***Pengambilan sampel dan preparasi ekstrak daging ikan gurami***

Ikan gurami segar diperoleh dari 3 pasar tradisional di Kab. Sleman Yogyakarta, secara random terkendali. Ikan gurami yang dipilih berbobot sekitar 500 g agar didapat daging tanpa duri sebanyak 150 g.

Seratus lima puluh gram daging ikan gurami segar dibersihkan dan dipisahkan dari duri serta kulitnya, lalu diblender sampai homogen. Ditimbang dengan seksama sampel daging yang telah dihomogenkan lebih kurang 10 g yang terbagi dalam 4 empat tabung reaksi 15 ml, masing-masing tabung berisi daging ikan gurami sebanyak 2,5 g. Kemudian ditambahkan 4 ml aquabides, lalu dihomogenkan dengan vortex selama 3 menit dan didiamkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 12 ml etil asetat, lalu ditutup dan dihomogenkan dengan vortex selama 5 menit (Anonim, 2009b). Lalu disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 4.000 rpm hingga diperoleh 3 lapisan yaitu di bagian terbawah lapisan daging, kemudian fase air, dan pada bagian atas merupakan fase etil asetat. Pipet 8,4 ml lapisan organik (lapisan atas), lalu diuapkan pada suhu 50°C dengan mengalirkan gas nitrogen hingga tidak ada lagi etil asetat yang tersisa (Degroodt et al., 1992).

Residu disuspensikan dengan 2,8 ml campuran n heksan & kloroform 1:1 (v/v), dan ditambahkan 1,4 ml etanol 2%, divortex selama 3 menit. Larutan kemudian disentrifuse pada kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit, lalu diambil supernatannya (lapisan bagian atas yang merupakan fase etanol), dan supernatan siap diinjeksikan pada HPLC. Selanjutnya dilakukan

pengerjaan blanko aquabides 5 mL sebagai pengganti ikan, dan dilakukan tahapan kerja seperti di atas.

#### Uji kualitatif

##### a. Menggunakan pereaksi NaOH

Sepuluh gram ekstrak daging ikan gurami direaksikan dengan 2 g NaOH dan 3 ml aquades, kemudian dipanaskan sampai mendidih. Jika dalam daging tersebut benar-benar terkandung residu CAP, maka ekstrak daging ikan gurami akan mengalami perubahan warna yang semula jernih berubah menjadi kuning kuat (Autheroff dan Kovar, 1987).

##### b. Membandingkan *retention time* ( $t_R$ )

Sebanyak 100  $\mu$ l ekstrak daging ikan gurami diinjeksikan pada HPLC dengan kondisi yang telah diatur sebelumnya. Bila hasil kromatogram pada analisis sampel menunjukkan adanya *puncak* pada  $t_R$  yang relatif sama dengan  $t_R$  pada standar CAP, maka secara kualitatif dinyatakan dalam sampel daging ikan gurami tersebut terkandung residu CAP.

#### Uji kesesuaian sistem

##### a. Resolusi (R)

Nilai resolusi ditentukan dari puncak CAP pada kromatogram sampel ikan gurami dari salah satu pasar. Fase etanol yang diperoleh diinjeksikan pada HPLC dengan fase diam C-18 (150 mm x 4,6 mm) 5  $\mu$ m, fase gerak campuran metanol : air (40:60), kecepatan alir 1 ml/menit, detektor UV pada  $\lambda$  277 nm, sehingga dihasilkan kromatogram sampel. Kemudian dari kromatogram sampel tersebut ditentukan resolusi dengan rumus (Kazakevich dan Lobrutto, 2007):

$$R = \frac{2[(t_R)_2 - (t_R)_1]}{W_2 + W_1}$$

Keterangan:

R : resolusi  
 $(t_R)_2$  dan  $(t_R)_1$  : waktu retensi dua komponen (menit)  
 $W_2$  dan  $W_1$  : lebar puncak dua komponen (menit)

##### b. Selektivitas ( $\alpha$ )

Nilai selektivitas dapat sama dengan satu atau lebih besar dari satu. Bila nilai  $\alpha = 1$  berarti senyawa satu dan dua keluar dari kolom bersamaan (senyawa 1 tidak dapat dipisahkan dari senyawa 2). Selektivitas ditentukan dengan rumus (Kazakevich dan Lobrutto, 2007):

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{(t_R)_2 - t_M}{(t_R)_1 - t_M}$$

Keterangan :

$k'_2$  dan  $k'_1$  : kapasitas kolom komponen pertama dan komponen kedua  
 $(t_R)_2$  dan  $(t_R)_1$  : waktu retensi dua komponen (menit)  
 $t_M$  : waktu retensi puncak pertama yang muncul

##### c. Faktor asimetri

Untuk menentukan tingkat asimetri puncak dilakukan dengan menghitung faktor asimetris atau disebut juga dengan *tailin g factor* (TF) yang dinyatakan dengan rasio antara lebar setengah tinggi puncak (Harvey, 2000).

d. Efisiensi kolom (N)

Nilai N yang tepat yaitu lebih dari 2000. Semakin besar harga N maka semakin efisien pula pemisahannya (Sherma dan Fried, 1996). Efisiensi kolom dapat ditentukan dengan rumus (Kazakevich dan Lobrutto, 2007):

$$N = \frac{16t_R^2}{W^2}$$

**Preparasi larutan standar (baku pembanding CAP)**

Larutan stok CAP dibuat dengan caraditimbang seksama 0,1 g baku CAP pada gelas piala kecil, lalu ditambahkan 2 ml etanol, aduk hingga homogen kemudian dipindahkan ke dalam labu takar 100 ml lalu ditambah aquabides ad 100 ml (1000 ppm (*part per million*)). Kemudian dibuat larutan standar 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml dengan mengencerkan larutan stok menggunakan pelarut. Lalu dari baku 1 µg/ml akan dibuat seri kadar 5, 10, 20, dan 40 ng/ml (Anonim, 2009b). Larutan standar CAP 1 µg/ml dibaca absorbansinya pada spektrofotometer UV pada range 200 - 400 nm untuk memperoleh spektrum serapan dan panjang gelombang maksimum CAP.

**Validasi metode**

a. Kurva Baku

Seri kadar dibuat dengan konsentrasi 5, 10, 20, dan 40 ng/ml dengan cara mengencerkan larutan baku CAP 1 µg/ml. Kemudian masing-masing kadar, dari konsentrasi terendah, diinjeksikan sebanyak 100 µL ke dalam HPLC dengan menggunakan kolom C-18. Fase gerak campuran metanol pro HPLC : aquabides (40:60), kecepatan aliran 1 mL/menit, dengan detektor UV pada panjang gelombang 277 nm (Anonim, 2009b). Lalu diamati *retention time* ( $t_R$ ) dan luas puncak atau *Area Under Curve* (AUC) dari masing-masing larutan yang diinjeksikan. Data konsentrasi serta AUC diolah dengan regresi linier untuk menentukan linieritasnya.

b. Pengujian batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi metode (LOQ)

LOD dan LOQ ditentukan melalui kurva baku yang didapat. Nilai LOD setara dengan  $3,3x(Sy/x)/b$  sedangkan LOQ setara dengan  $10x(Sy/x)/b$  (Ermer dan Miller, 2005).

c. Presisi

Pengujian presisi yang dilakukan hanya mencakup satu tahap yaitu *repeatability precision*. Kadar yang digunakan adalah 20 ng/ml yang kemudian diinjeksikan pada HPLC dan dilakukan repitansi sebanyak enam kali. Data yang diperoleh yakni  $t_R$  dan AUC, kemudian dihitung rata-rata, *Standard Deviation* (SD), dan *Relative Standard Deviation* (RSD) (Ermer dan Miller, 2005).

d. Akurasi

Pengujian akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku. Sampel yang akan dianalisis diperkirakan memiliki konsentrasi 10 - 15 ng/ml. Sampel tersebut lalu ditambah larutan standar CAP dengan konsentrasi 10 ng/ml. Kemudian diinjeksikan pada HPLC dan dilakukan repitansi sebanyak enam kali. AUC yang diperoleh digunakan untuk menentukan kadar terukur. Persen akurasi ditentukan dengan menentukan berapa persen larutan standar yang ditambahkan dapat ditemukan (Harmita, 2004).



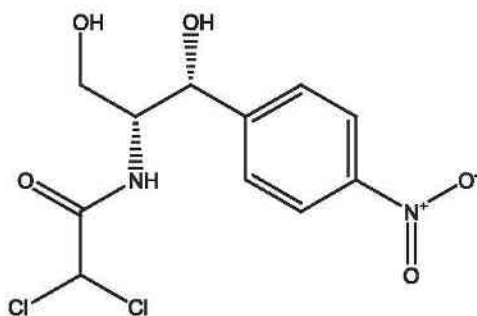
### Penetapan kadar residu CAP

Seratus mikroliter ekstrak daging diinjeksikan ke dalam HPLC dengan kondisi yang telah disebutkan sebelumnya. Pada pengujian kadar dilakukan replikasi preparasi sampel sebanyak tiga kali untuk tiap-tiap pasar dan setiap replikasi dilakukan repetisi injeksi sebanyak tiga kali. Perhitungan kadar residu CAP dalam daging ikan gurami dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva baku. Kadar residu antibiotik CAP yang diperoleh dibandingkan dengan BMR (Batas Maksimum Residu) antibiotik berdasarkan SNI 01-6366-2000 tentang batas maksimum cemaran mikroba dan batas maksimum residu dalam bahan makanan asal hewan (Anonim, 2000c).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsumen di dalam dan di luar negeri dewasa ini semakin menuntut persyaratan mutu pangan yang terjamin baik. Adapun beberapa persyaratan produk yaitu terbebas dari residu (*residu free*) baik terhadap bahan hayati, bahan kimia, pestisida, logam berat, antibiotik, hormon, dan obat-obatan lainnya maupun terhadap cemaran mikroba yang dapat menularkan penyakit serta memiliki kualitas yang baik. Hal ini akan terpenuhi apabila terdapat pengawasan yang ketat sejak dini dari teknik pembudidayaan, pemberian pakan, penyimpanan, dan pendistribusiannya sampai ke konsumen (Anonim, 2000c).

Meskipun penggunaan CAP telah dilarang, masih ada kasus ditemukannya residu antibiotik CAP pada daging ikan dan udang untuk konsumsi (Neuhaus *et al.*). Mengingat risiko bahaya CAP kepada manusia, dipersyaratkan suatu metode untuk menganalisis CAP memiliki kemampuan deteksi  $0,3 \mu\text{g/kg}$  (*European Legislation*) (Huang *et al.*, 2009). Metode penetapan kadar CAP pada ikan gurami mengikuti metode Standar Nasional Indonesia (SNI) 2354.9:2009 tentang penentuan residu CAP dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan dan metode oleh Degroodt *et al.* (1992). CAP diketahui sangat mudah larut dalam etil asetat dan etanol sehingga digunakan pelarut tersebut untuk mengekstraksi residu CAP dari daging ikan gurami.



Gambar 1. Struktur formula kloramfenikol

Penelitian oleh Tamošiūnas *et al.* (2006) menunjukkan efisiensi ekstraksi menggunakan etil asetat meningkatkan perolehan kembali CAP mencapai 85 - 90% dibandingkan dietil eter. Etil asetat diuapkan pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  sambil dialiri gas nitrogen hingga tidak ada lagi etil asetat yang

tersisa, yang ditandai dengan hilangnya aroma khas etil asetat (Degroodt *et al.*, 1992). Proses penguapan dibantu dengan dialirkannya gas nitrogen. Gas nitrogen bersifat inert sehingga tidak akan bereaksi dengan CAP. Setelah etil asetat menguap, yang tersisa adalah cairan kuning kental menyerupai tampilan minyak.

Proses pembersihan (*clean-up*) ekstrak CAP dapat menggunakan prosedur *solid phase extraction* (SPE) (Guy *et al.*, 2004; Forti *et al.*, 2005), namun akan memperlama waktu analisis. Oleh karena itu, digunakan teknik *clean-up* yang lebih sederhana yaitu ekstraksi cair-cair (Tamošiūnas *et al.*, 2006; Rodziewicz dan Zawadzka, 2008). Ditambahkan campuran n-heksan : kloroform (1:1 v/v) untuk menarik senyawa-senyawa non-polar (lipid) yang masih tersisa, sedangkan untuk menarik senyawa CAP pada sampel digunakan pelarut etanol.

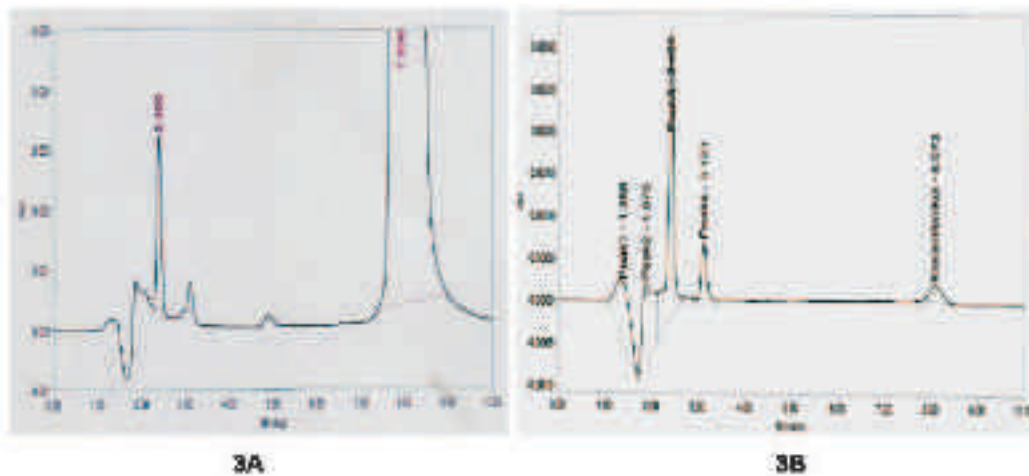
Fase etanol merupakan fase yang siap diinjeksikan pada HPLC. Sering kali terjadi kegagalan pada tahap akhir ini, yang ditandai dengan fase etanol yang tidak jernih, membentuk berupa cairan berbuih seperti emulsi sehingga tidak dapat diinjeksikan. Hal ini dapat diatasi dengan memperlama proses sentrifugasi atau menambah kecepatan putaran hingga 25000 rpm selama 5 menit (Tamošiūnas *et al.*, 2006). Gambar 2A dan 2B memperlihatkan tahapan-tahapan dalam proses ekstraksi ini.



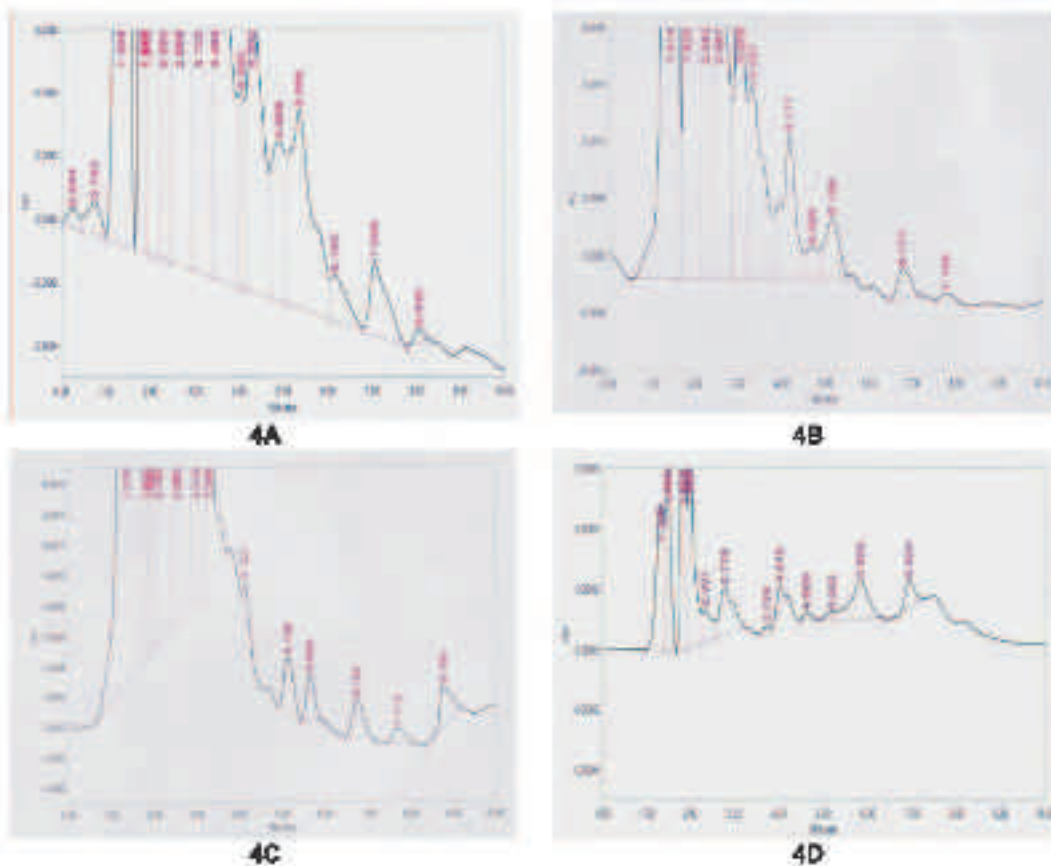
**Gambar 2A.** Hasil ekstraksi dengan aquabides dan etil asetat sehingga terbentuk tiga lapisan berbeda (1. Daging ikan; 2. Fase aquabides; 3. Fase etil asetat); **2B.** Hasil ekstraksi daging ikan gurami yang siap diinjeksikan (lapisan atas adalah fase etanol yang diinjeksikan, lapisan bawah berupa fase n-heksan:kloroform)

#### **Uji kualitatif**

Uji kualitatif menggunakan pereaksi natrium hidroksida menunjukkan sampel daging ikan gurami yang dibeli dari ketiga pasar tersebut tidak menunjukkan perubahan warna (negatif CAP). Hal ini dimungkinkan karena residu CAP dalam daging ikan gurami berada dalam konsentrasi yang cukup kecil yakni *part per billion* (ppb), sehingga bisa digunakan pereaksi tertentu, seperti NaOH, uji kualitatif tersebut tidak cukup sensitif untuk mendeteksi keberadaan residu CAP.



**Gambar 3A.** Kromatogram standar CAP 100 µg/ml yang diperbesar (puncak CAP pada menit ke-7,998); **3B.** Kromatogram standar CAP 20 ng/ml (puncak CAP pada menit ke-8,073). Metode analisis menggunakan fase diam C-18 (150 mm x 4,6 mm) 5 µm, fase gerak metanol : air (40:60), kecepatan alir 1 ml/menit, detektor UV pada λ 277 nm



**Gambar 4.** Kromatogram sampel ikan gurami di ketiga pasar tradisional. **4A.** Pasar 1 CAP muncul pada rata-rata menit ke-8,088 ± 0,08 ( $\bar{x} \pm SD$ ) ; **4B.** Pasar 2 CAP muncul pada rata-rata menit ke-7,779 ± 0,09; **4C.** Pasar 3 CAP muncul pada rata-rata menit ke-8,006 ± 0,03; **4D.** Kromatogram sampel blanko. Metode analisis yang digunakan sama dengan gambar sebelumnya (Gambar 3)

Dilakukan uji kualitatif lain terhadap sampel dengan pemeriksaan kromatogram menggunakan metode kromatografi (HPLC). Masing-masing analit tertentu dalam kromatogram diwakili oleh puncak. Jarak maksimum puncak dari titik injeksi dinyatakan dalam unit waktu disebut waktu retensi ( $t_R$ ), dan berfungsi sebagai pengidentifikasi untuk analit pada sistem tertentu. Waktu retensi mungkin deskriptor yang paling banyak digunakan dari sifat analit, dan itu adalah parameter yang paling mudah diukur. Sehingga menjadikannya sebagai parameter paling universal (Kazakevich dan Lobrutto, 2007). Dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai  $t_R$  yang sama jika diukur pada kondisi HPLC yang sama (Gandjar dan Rohman, 2009). Hasil kromatogram sampel ketiga pasar menunjukkan munculnya puncak pada  $t_R$  yang relatif sama dengan  $t_R$  standar CAP (Gambar 3 dan 4), yakni pada menit ke-7,958  $\pm$  0,15 ( $\bar{x} \pm SD$ ) dan ke-8,119  $\pm$  0,04 untuk masing-masing sampel dan standar CAP. Sehingga secara kualitatif dinyatakan bahwa ikan gurami yang dijual di ketiga pasar tersebut mengandung residu antibiotik CAP. Terjadi sedikit perbedaan waktu retensi sampel dan standar CAP (< 2 %), kemungkinan disebabkan ada satu bagian pada fase diam yang menahan analit lebih kuat dibandingkan bagian lain atau terjadi transfer massa yang belum seimbang pada kolom (Harvey, 2000).

#### **Profil kromatogram**

Profil kromatogram umumnya disampaikan untuk memberikan informasi kondisi kolom, sistem, dan ihwal pemisahan suatu analit. Sehingga profil kromatogram juga dapat dijadikan sebagai penilaian uji kesesuaian sistem. Uji kesesuaian sistem lebih sering diterapkan pada instrumen analisis. Uji tersebut dirancang untuk mengevaluasi komponen-komponen sistem analisis secara periodik untuk menunjukkan bahwa kinerja sistem memenuhi standar yang dipersyaratkan metode tersebut (Watson, 2007) dan menentukan apakah sistem pengoperasiannya bekerja dengan baik (Adamovics, 1997). Profil kromatogram meliputi faktor retensi ( $k$ ), efisiensi ( $N$ ), selektivitas ( $\alpha$ ) dan resolusi ( $R$ ) (Kazakevich dan Lobrutto, 2007).

#### **Resolusi (R)**

Derajat pemisahan dua komponen campuran dalam proses kromatografi dinyatakan dengan resolusi ( $R$ ) (Hendayana, 2006). Resolusi yang baik bila nilai  $R \geq 1,5$  (Adamovics, 1997; Kazakevich dan Lobrutto, 2007). Hal ini berarti dua komponen zat terpisah sempurna dengan jarak waktu singkat antara puncak pertama dan puncak kedua. Lebih kurang hanya 0,13% area (dasar) puncak yang tumpang tindih dengan (dasar) puncak lain dengan nilai  $R = 1,5$ . Nilai resolusi yang rendah dapat ditingkatkan dengan meningkatkan efisiensi kolom dan selektivitas kolom terhadap analit (Harvey, 2000). Hasil penelitian diperoleh nilai  $R$  sebesar 1,644, sehingga dapat disimpulkan dua komponen zat terpisah cukup sempurna dalam proses kromatografi.

#### **Faktor asimetri**

Bila puncak yang akan dikuantifikasi ternyata asimetris, maka perhitungan asimetrisitas perlu dilakukan untuk mengontrol atau mengkarakterisasi sistem kromatografi. Faktor asimetri yang baik yaitu satu (1). Hasil penelitian menunjukkan faktor asimetri yang diperoleh yaitu 1,013, sehingga dapat disimpulkan bahwa puncak yang dihasilkan tidak melebar dan cukup simetri sehingga dalam proses kromatografi terjadi pemisahan yang efisien. Tidak adanya interaksi yang

kuat analit tertentu dengan fase diam dan pada konsentrasi analit yang relatif rendah menghasilkan puncak yang simetris dan menyerupai kurva gaussian khas (Kazakevich dan Lobrutto, 2007).

#### Efisiensi kolom (N)

Tingkat efisiensi pemisahan dengan kromatografi tercermin pada puncak-puncak kromatogram yang dihasilkannya. Semakin lebar suatu puncak kromatogram maka pemisahan semakin kurang efisien. Lebar puncak merupakan pengaruh kinetik yang berkenaan dengan pergerakan analit serta interaksinya dengan fase gerak dan fase diam (Harvey, 2000). Semakin besar nilai N maka semakin efisien pemisahannya (Hendayana, 2006). Tingkat efisiensi kolom juga akan mempengaruhi resolusi kromatogram. Semakin kecil lebar puncak akan menghasilkan resolusi yang semakin baik. Hasil penelitian menunjukkan efisiensi kolom yang diperoleh yaitu 2592,542. Hal ini menunjukkan bahwa selama proses kromatografi terjadi pemisahan yang efisien.

#### Selektivitas ( $\alpha$ )

Selektivitas merupakan suatu ukuran seberapa mampu metode tersebut mengukur analit saja dengan adanya senyawa-senyawa lain yang terkandung di dalam sampel. Pada sistem kromatografi selektivitas merupakan ukuran keterpilihan dua komponen campuran yang dipisahkan. Bila harga  $\alpha > 1$  maka senyawa pertama keluar dari kolom lebih cepat daripada senyawa kedua. Semakin besar harga  $\alpha$ , semakin baik pemisahan senyawa menggunakan metode tersebut (Hendayana, 2006). Diperoleh hasil  $\alpha$  sebesar 1,184. Hal ini menunjukkan bahwa selama proses kromatografi terjadi pemisahan yang baik.

**Tabel 1.** Parameter uji kesesuaian sistem metode HPLC yang digunakan dalam analisis residu CAP pada ikan gurami

No	Variabel	Hasil
1	Fase gerak	Metanol : Aquabides (40:60)
2	Fase diam	C-18 (150 mm x 4,6 mm) 5 $\mu$ m
3	Kecapatan alir	1 ml/menit
4	Resolusi	1,664
5	Faktor asimetri	1,013
6	Efisiensi kolom (N)	2592,542
7	Selektivitas	1,184

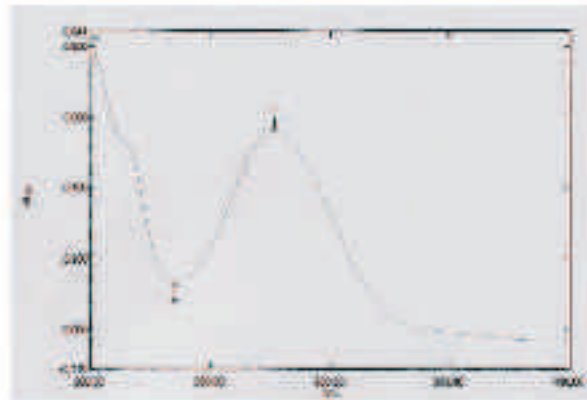
#### Validasi metode

Validasi metode merupakan proses pembakuan suatu metode analisis untuk memastikan bahwa metode tersebut masih sesuai bila digunakan untuk menyajikan hasil tes yang dapat dipercaya. Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia (USP) Vol 23* tahun 1995, dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduisibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Tidak dilakukan validasi lengkap (*full validation*) karena penelitian ini mengadopsi pada metode yang telah terstandar, SNI 2354.9:2009. Parameter-parameter yang diverifikasi antara lain: linieritas, *Limit of Detection (LOD)*, *Limit of Quantitation (LOQ)*, presisi dan akurasi.

#### Optimasi $\lambda$ max

Optimasi  $\lambda$  max dilakukan agar saat dilakukan pengukuran terhadap suatu senyawa pada  $\lambda$  max, metode yang digunakan memiliki kemampuan untuk mengukur zat yang dituju secara tepat

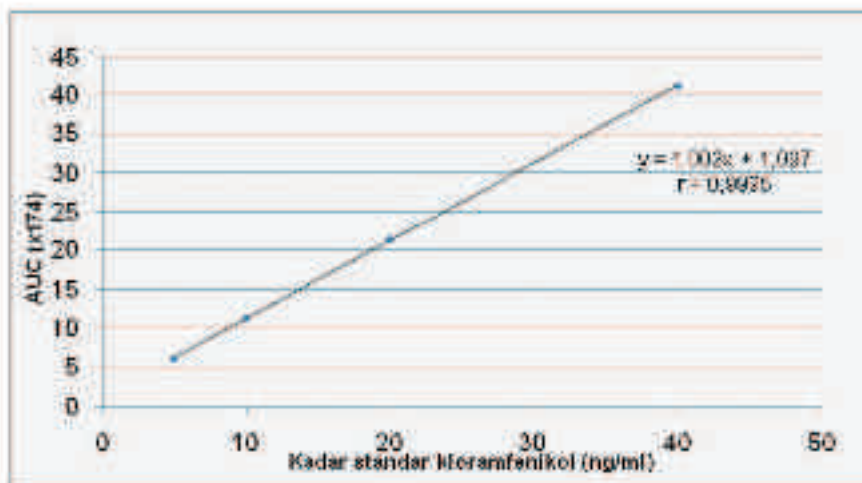
dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks (Hamita, 2004).



**Gambar 5.** Hasil optimasi  $\lambda$  max CAP (konsentrasi 1 ppm menggunakan pelarut melanol dan air, menunjukkan  $\lambda$  max = 277 nm)

**Linieritas**

Kebanyakan metode analisis didasarkan pada proses-proses yang metodenya menghasilkan suatu respon yang linier dan yang meningkat atau menurun secara linier sebanding dengan konsentrasi analit. Sehingga linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan (Watson, 2007; Gandjar dan Rohman, 2009). Ukuran statistik untuk manfaat kesesuaian garis melalui data seri kadar larutan standar adalah koefisien korelasi ( $r$ ). Suatu koefisien korelasi  $> 0,99$  dianggap menunjukkan linieritas (Watson, 2007).



**Gambar 6.** Kurva regresi linier standar CAP

Residu CAP dalam daging ikan gurami dengan rentang kadar 5 sampai 40 ng/ml dijamin linieritasnya dengan  $r$  0,9995. Dengan demikian apabila digunakan untuk menghitung kadar sampel

daging ikan gurami dengan kandungan residu CAP yang masuk dalam range tersebut, dapat dijamin kevaliditasnya.

Diketahui pula dari persamaan garis, metode yang digunakan memiliki respon linier  $y = 174,44x + 191$ . Kepekaan dapat dilihat sebagai kemiringan suatu kurva respon dan mungkin merupakan suatu fungsi dari metode itu sendiri. Kepekaan metode menunjukkan seberapa responsif metode tersebut terhadap sedikit perubahan dalam konsentrasi suatu analit (Watson, 2007).

#### Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Semakin kecil nilai LOD dan LOQ yang dihasilkan, maka metode yang digunakan semakin sensitif untuk menganalisis suatu sampel. Penelitian menunjukkan metode yang digunakan dapat mendeteksi keberadaan residu CAP dalam daging ikan gurami, apabila konsentrasinya lebih dari atau sama dengan 0,544 ng/ml (LOD). Sedangkan konsentrasi terendah residu CAP dalam daging ikan gurami yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode ini adalah 1,951 ng/ml (LOQ). Nilai LOD yang dihasilkan belum memenuhi persyaratan *European Union (EU)*, bahwa kemampuan metode untuk mendeteksi residu CAP pada bahan pangan asal hewan hendaknya 0,3 µg/kg.

#### Presisi

Berdasarkan pedoman *International Conference on Harmonization (ICH)*, presisi mungkin diperlengkapi pada tiga tingkatan: ketelitian, presisi intermedial, dan reproduibilitas (Watson, 2007). Pengujian presisi yang dilakukan hanya mencakup *repeatability precision*. Kemungkinan besar penetapan kadar dapat diulangi oleh orang yang sama dengan menggunakan instrumen tunggal. Menurut *Association of Analytical Chemist (AOAC)* pada kadar lebih dari 10 ppb, presisi dianggap memenuhi syarat bila *Relative Standard Deviation (RSD)*  $t_R$  dan AUC-nya tidak lebih dari 15 % (Anonim, 2002b). Nilai presisi metode ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. *Repeatability precision CAP*

No	Tinggi puncak	Luas area puncak	$t_R$ (menit)
1	186	3032	7,408
2	191	3128	7,361
3	189	3035	7,323
4	192	3120	7,292
5	190	3108	7,268
6	188	3092	7,312
$\bar{x}$	189	3086	7,327
SD	2,16	42,32	0,050
RSD (%)	1,14	1,372	0,687

Keterangan:  $\bar{x}$  = rata-rata; SD = standar deviasi;  
RSD = standar deviasi relatif

#### Akurasi

AOAC mendefinisikan akurasi sebagai kedekatan antara hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya (Anonim, 2002b). Akurasi juga dapat didefinisikan sebagai ukuran yang menunjukkan

derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (Harmita, 2004). Parameter nilai akurasi adalah *recovery* atau perolehan kembali. Digunakan metode penambahan baku, yaitu ditambahkan sejumlah larutan standar dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa kemudian dianalisis. *Recovery* diketahui dengan menentukan persen analit yang ditambahkan dapat ditemukan kembali dari hasil analisis (Harmita, 2004). Codex Alimentarius volume 3 tentang residu obat untuk hewan ternak dalam makanan, menyebutkan jika kadar yang akan dianalisis berkisar antara  $\geq 10$  ppb dan  $< 100$  ppb maka *range recovery* yang dapat diterima berkisar antara 70 – 110 % (Anonim, 2002b). Hasil perhitungan *recovery* tersaji dalam Tabel 3.

Tabel 3. Data perhitungan akurasi

No	Konsentrasi sampel + standar (ng/ml)	Konsentrasi sampel (ng/ml)	Konsentrasi standar (ng/ml)	Akurasi (%)
1	31,329	18,946	10	123,628
2	28,313	18,946	10	93,670
3	27,843	18,946	10	88,970
4	29,833	18,946	10	108,870
5	29,345	18,946	10	103,990
6	30,733	18,946	10	117,870
Rata-rata				106,200

#### Penetapan kadar

Mengingat bahaya residu antibiotik terhadap kesehatan manusia maka perlu adanya Batas Maksimum Residu (BMR) dalam produk ternak untuk masing-masing golongan antibiotik. Berdasarkan SNI 01-6366-2000 tentang batas maksimum cemaran mikroba dan batas maksimum residu dalam bahan makanan asal hewan, BMR CAP pada daging adalah 0,01 mg/kg (Anonim, 2000c). BMR pada SNI jauh lebih tinggi dibandingkan BMR yang ditetapkan negara lain, seperti Rusia (0,5 unit/g) (Sokolova dan Chernyaev, 2001); China (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); *European Union* (EU) (0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Zheo dan Bail, 2009) Tabel 4 menunjukkan kadar residu CAP dari ketiga pasar tidak melebihi BMR oleh SNI 01-6366-2000, namun satu diantaranya tidak memenuhi persyaratan EU.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar residu CAP dalam sampel ikan gurami

Pasar	Kadar (ng/ml)	Kadar (ng/g)
1*	2,005	0,281
2	8,346	1,168
3*	1,968	0,276

\*Catatan : Perhitungan berdasarkan ekstrapolasi

Meskipun demikian, hasil penelitian ini menunjukkan tingkat penyalahgunaan antibiotik, khususnya CAP, pada ikan gurami untuk tujuan non-terapeutik masih ada khususnya di Jawa Tengah dan D.I.Yogyakarta. Mengingat para penjual ikan gurami di ketiga pasar yang disampling memperoleh ikan gurami tidak terbatas dari Yogyakarta namun juga berasal dari beberapa kota di Jawa Tengah seperti Semarang. Temuan ini diharapkan dapat menjadi bagian pengawasan pangan untuk masyarakat dan konsumen agar menjadi lebih cermat dalam memilih jenis pangan untuk dikonsumsi.





- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2009, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 378-389, 465-472
- Guy, P.A., Royer, D., Mottier, P., Gremaud, E., Perisset, A., Stadler, R.H., 2004, Quantitative Determination of Chloramphenicol in Milk Powder by Isotop Dilution Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A.*, vol.1054, p 365-371
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vol.1, p 117 – 135
- Harvey, D., 2000, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Companies, USA
- Hendayana, S., 2006, *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*, Remaja Rosdakarya, Bandung, 10-17, 21-22, 67-71, 83-94
- Huang, Z.Y., Yan, Q.P., Zhang, Q., Peng, A.H., 2007, Sample Digestion for Determining Chloramphenicol Residues in Carp Serum and Muscle, *Aquacult Int.*, vol.2009, p 69-76
- Kazakevich, Y. dan Lobrutto, R., 2007, *Intoduction HPLC Theory and Practice*, dalam HPLC for Pharmaceutical Scientists oleh Yuri Kazakevich dan Rosario Lobrutto, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey
- Neuhaus, B.K., Hurlbut, J.A., Hammack, W., *LC/MS/MS Analysis of Chloramphenicol in Shrimp*, Laboratory Information Bulletin, FDA/ORA/DFS, p 1-18
- Rodziewicz, L. dan Zawadzka, I., 2008, Rapid Determination of Chloramphenicol Residues in Milk Powder by Liquid Chromatography-Elektrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Talanta*, vol.75, p 846-850
- Sherma, J. dan Fried, B., 1996, *Handbook of Thinlayer Chromatography*, Second Edition, Marcel Dekker Inc, New York
- Sokolova, L.I. dan Chernyaev, A.P., 2001, Determination of Benzylpenicilin, Levomycetin (Chloramphenicol), and Tetracycline in Food Products by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Analytical Chemistry*, vol.56, p 1032-1034
- Tamošiūnas V., Petraltis J., dan Padaruskas A., 2006, Chloramphenicol Determination in Milk by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, *CHEMIJA*, Vol. 17, No. 2– 3, p 25 – 29
- Watson, D.G., 2007, *Analisis Farmasi Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi*, Ed. 2, Penerbit Buku Kedokteran, EGC, Jakarta
- Yuningsih, 1994, Keberadaan Residu Antibiotik Dalam Produk Peternakan (Susu dan Daging), *Laporan Penelitian Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan*, Balai Penelitian Veteriner, Bogor
- Zhao, L. dan Ball, C.H., 2009, *Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT- Solid Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Application Note-Food Safety, Agilent Technologies, Inc., USA