

## **BAB IV**

### **PROSEDUR**

#### **4.1. Pembuatan Larutan Baku**

Untuk membuat larutan baku ini ditimbang 100 mg standar tetrasiklin, kemudian dilarutkan dengan metanol, lalu dimasukkan ke dalam labu takar dan ditempatkan 100 ml untuk mendapatkan konsentrasi larutan standar sebanyak 500 µl larutan standar tetrasiklin, lalu masukkan ke labu takar 5 ml, kemudian ditepatkan dengan metanol sehingga didapat larutan standar antibiotik tetrasiklin.

#### **4.2. Pembuatan Larutan Trikloroasetat 20%**

Pembuatannya dilakukan dengan menimbang 10 g asam trikloroasetat kemudian dilarutkan dengan akuabides, setelah itu dimasukkan ke dalam labu takar 50 ml dan ditera dengan akuabides.

#### **4.3. Pembuatan Larutan Bufer Mc Illvaine**

Pembuatan larutan Buffer Mc Illvaine dilakukan dengan cara menimbang masing-masing 1,18 g asam sitrat monohidrat, 3,362 g dinatrium hidrogenphosphat dihidrat, dan 1,372 g garam dinatrium EDTA lalu dimasukkan kedalam labu takar 100 ml, diencerkan dan ditera dengan akuabides.

#### **4.4. Pembuatan Metanol 5 %**

Pembuatan larutan metanol 5 % di lakukan dengan cara menuang metanol 5 ml kedalam labu takar 100 ml kemudian ditera dengan akuabides.

#### **4.5. Pembuatan Larutan Metanol Oksalat**

Larutan metanol oksalat dibuat dengan cara menimbang 1,297 g asam oksalat dan dilarutkan dengan metanol p.a kemudian dituang ke dalam labu takar 50 ml serta ditera dengan metanol p.a.

#### **4.6. Pembuatan Larutan Fase Gerak**

Pembuatan fase gerak dilakukan dengan cara mencampur 200 ml metanol dengan asam oksalat 0,0025 M dengan 50 ml asetonitril, setelah itu campuran di saring dengan menggunakan penyaring vakum dengan kertas saring 0,45  $\mu\text{m}$ , sehingga diperoleh perbandingan metanol dan asam oksalat 4:1 (v/v).

#### **4.7. Proses Ekstraksi Sampel**

Sebanyak 5 g hati ayam yang telah digiling ditempatkan dalam tabung sentrifuga, setelah itu di tambahkan 2 ml larutan asam trikloro asetat 20% kemudian diaduk, sampel ditambahkan 18 ml larutan Buffer Mc Ilvaine-EDTA kemudian di putar pada kecepatan 2.000 rpm selama 20 menit, larutan supernatan hasil sentrifuga dipisahkan dari residunya kemudian dimasukkan ke dalam kolom SPE sebelumnya kolom SPE diaktifkan dahulu dengan 10 ml metanol dan 10 ml air, lalu sampel dimasukan, kemudian kolom SPE dicuci dengan 10 ml metanol 5% kemudian kolom SPE tersebut dielusi dengan 6 ml metanol oksalat, setelah proses ekstraksi selsai, filtrat kemudian dipindahkan ke dalam cawan penangas sampai kering, kemudian setelah kering dilarutkan dengan 4 ml metanol dan 1 ml sampel di analisis dengan KCKT Agilent Technologies, 1220 infinity LC.

#### 4.8. Uji Linieritas

Untuk uji linearitas, dibuat larutan baku campuran antibiotik tetrasiklin dengan konsentrasi 0,1 ppm; 0,3 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 2 ppm ;3 ppm di lakukan dengan pengujian yang sama seperti kurva baku pada KCKT. Linieritas ditentukan dengan menggunakan metode regresi linear. Persamaan linearitas yang digunakan ialah  $y = a + bx$ , dengan a adalah titik potong dan b adalah kemiringan.

#### 4.9. Penentuan Batas Konsentrasi Terendah

Penentuan batas deteksi LOD dan LOQ menggunakan prosedur yang sama dengan uji linieritas sehingga hasil linieritas yang diperoleh dapat untuk menentukan LOD dan LOQ dengan menggunakan rumus :

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum (y - \hat{y})^2}}{n-2} \dots\dots\dots(1)$$

$$LOD = \frac{3 \times s_{y/x}}{b \text{ (slope)}} \dots\dots\dots(2)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s_{y/x}}{b \text{ (slope)}} \dots\dots\dots(3)$$

Dimana :

SB = simpangan baku

LOD = batas deteksi

LOQ = batas kuantitasi

#### 4.10. Uji Kesesuaian Sistem

Konsentrasi larutan baku yang telah dibuat sebelumnya disuntikkan sebanyak 7 kali ke dalam KCKT sebanyak 10  $\mu$ L. Dari hasil pengukuran simpangan baku.

#### 4.11. Akurasi

Sampel hati ayam dalam bentuk larutan ditambah dengan larutan baku tetrasiklin dengan konsentrasi 0,3 ppm ; 0,5 ppm dan 1 ppm, selanjutnya disuntikkan ke KCKT penyuntikan diulang sebanyak 3 kali. Persen perolehan kembali dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{a-b}{c} \times 100 \% \dots\dots\dots(4)$$

Dimana :

A = konsentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan bahan baku

B = konsentrasi sampel sebelum penambahan bahan baku

C = konsentrasi baku yang ditambahkan

#### 4.12 Presisi

Prosedur yang digunakan sama dengan akurasi Selanjutnya dilakukan prosedur penetapan kadar seperti yang telah disebutkan diatas. Dirumuskan dengan

$$\text{persamaan : } SD = \frac{\sqrt{\sum(x - x \text{ rata})^2}}{n-1} \dots\dots\dots(5)$$

$$RSD = \frac{SD}{x} \times 100 \% \dots\dots\dots(6)$$

Dimana :

RSD = Standar Deviasi Relatif (%)

SD = Standar deviasi

X = kadar rata-rata sampel