

## **BAB V**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **5.1.Preparasi Sampel**

Larutan standar dibuat dengan melarutkan standar tetrasiklin sebanyak 10 mg dalam metanol 100 ml dari larutan standar tersebut lalu dibuat larutan baku dengan konsentrasi 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 1 ; 2 ; 3 ppm, masing-masing larutan baku diinjeksikan ke HPLC lalu dibuat kurva baku kadar obat dengan luas area. Persamaan regresi linear yang didapat adalah  $y = 5991957,221x + 845064,655$ .

Pembuatan larutan trikloroasetat dimaksudkan untuk memecah ikatan protein dalam hati ayam yang memiliki senyawa kompleks untuk mendapatkan hasil yang baik pada saat proses ekstraksi sampel, untuk mempertahankan pH pada hati ayam agar tetap stabil dan senyawa tetrasiklin yang terkandung tidak rusak pada saat proses ekstraksi ditambahkan larutan buffer, metanol 5 % pelarut dengan daya elusi rendah untuk mengelusi kolom SPE pada saat sampel dimasukkan untuk melarutkan senyawa pengotor yang bersifat polar agar ekstraksi yang dihasilkan bersih dari senyawa senyawa pengotor, dan metanol oksalat mengelusi kolom SPE setelah metanol 5 % untuk melarutkan tetrasiklin yang terjerap dalam kolom SPE agar larut dan tersaring kemudian dianalisa di HPLC.

## 5.2. Pengujian Sampel

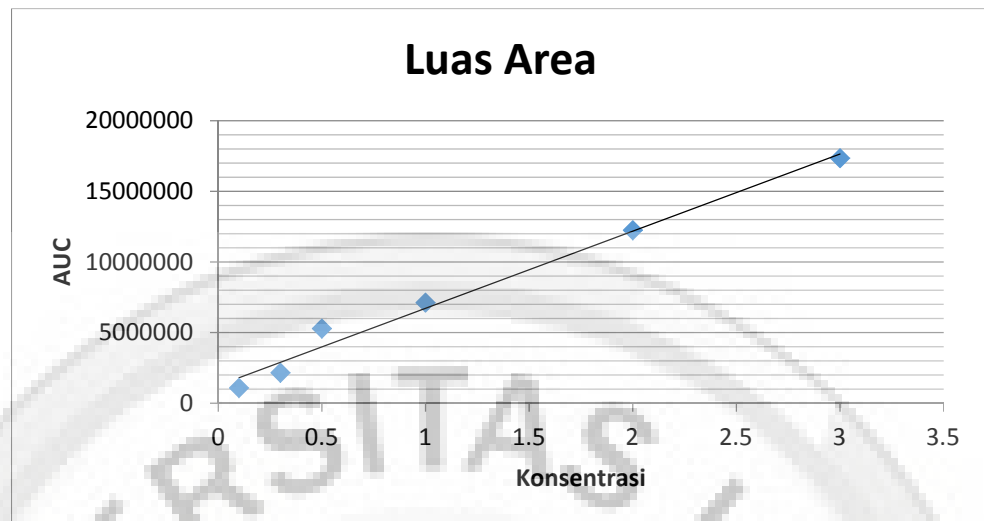
Pada penelitian ini pertama-tama sampel hati ayam dilakukan penggilingan terlebih dahulu sampai halus menggunakan blender sebelum dilakukan preparasi sampel. Dari masing-masing sampel ditimbang sebanyak 5 g dan ditempatkan di gelas kimia kemudian ditambahkan 2 ml asam trikloroasetat yang penggunaannya untuk memecah ikatan protein yang terkandung dalam sampel agar mempermudah proses ekstraksi sampel, lalu sampel diaduk dan ditambahkan 18 ml larutan buffer Mcillvaine sebagai larutan penyangga yang nantinya akan menahan senyawa tetrasiklin yang akan diekstraksi tetap stabil, kemudian sampel ditempatkan di dalam tabung sentrifuga untuk memisahkan larutan supernatan dengan residunya dimana larutan supernatan yang terpisah nanti akan dimasukkan kedalam kolom SPE, dimana Prinsip dari SPE yaitu analit terperangkap (*dead stopped*) pada medium SPE dengan cara memasukannya pada selongsong di dalam suatu pelarut yang memiliki daya mengelusi rendah, analit tersebut kemudian dapat dibilas dengan pelarut lain yang berdaya elusi rendah kemudian akhirnya dielusi dengan pelarut kuat bervolume kecil. Ekstraksi Fase Padat bermanfaat untuk pemisahan selektif pengganggu-pengganggu dari analit, yang tidak mudah dicapai dengan ekstraksi cair-cair.

Setelah kolom SPE diaktifkan dahulu dengan 10 ml metanol dan 10 ml air kemudian sampel yang berupa larutan supernatan dimasukkan kedalam kolom SPE setelah larutan supernatan tersaring semua kemudian kolom SPE di cuci dengan 10 ml metanol 5 %, kemudian kolom SPE di elusi dengan 6 ml metanol oksalat setelah proses ekstraksi selsai lalu filtrat kemudian di tempatkan dicawan

penangas lalu dipanaskan pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  hal ini bertujuan untuk agar tetrasiklin yang terkandung didalamnya tidak rusak karena suhu terlalu panas. Pemanasan dilakukan sampai filtrat mengkristal kemudian dilarutkan dengan 4 ml metanol, dan sebanyak 1 ml sampel di analisa dengan KCKT Agilent Technologies, 1220 infinity LC dengan fase gerak metanol asam oksalat dan asetonitril dengan perbandingan 4 : 1.

### 5.3. Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk menjamin bahwa alat yang digunakan dapat menjamin sistem analisis beroperasi secara benar dengan persyaratan nilai % RSD tidak melebihi dari 2%. Pada percobaan ini hasil % RSD yang diperoleh adalah 0,504%. Hal ini menunjukkan bahwa sistem analisis telah beroperasi secara benar dan sesuai dengan yang disyaratkan.



**Gambar. V.1.** Kurva Kalibrasi Antara Standar Tetrasiklin dengan Luas Area (AUC)

#### 5.4 Uji Linearitas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x), hasil pengukuran yang didapat dari data kurva kalibrasi persamaan  $y = 5991957,221x + 845064,655$  dan r yang diperoleh 0,986 setelah dilakukan perhitungan di dapat  $Sy/x = 11229$  dan  $Vx0 = 16,29\%$   $Vx0$  yang dipersyaratkan  $<2\%$  sehingga data yang diperoleh tidak sesuai dengan persyaratan.

### 5.5. Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan penambahan baku standar pada suatu sampel hasil data yang diperoleh sebagai berikut :

C (PPM)	(La sampel + Baku)	(La Sampel)	(La Spl + Bku) - (La Spl)	Kadar (x)	% Recovery
0.3	3618917	3812618	-193701	-0,173	-57,79
0.3	3607332	3812618	-205286	-0,175	-58,43
0.3	3592399	3812618	-220219	-0,178	-59,26
0.5	5240241	3812618	1427623	0,097	19,44
0.5	5242895	3812618	1430277	0,098	19,53
0.5	5249101	3812618	1436483	0,099	19,74
1	6160667	3812618	2348049	0,251	25,08
1	6378136	3812618	2565518	0,287	28,71
1	6320838	3812618	2508220	0,278	27,76

Tabel.V.2. Data Perhitungan Akurasi

Dari data tersebut dihitung persen perolehan kembali pada setiap konsentrasi dan hasil persen perolehan kembali yang didapat, dirata-ratakan untuk konsentrasi 0,3 ppm adalah -17,55 %, 0,5 ppm adalah 9,79 % dan 1 ppm adalah 27,18 %.

Akurasi perolehan kembali yang umum untuk senyawa dalam suatu campuran adalah kurang lebih 98-102% dan dari hasil yang diperoleh semua rata-rata persen perolehan kembali pada konsentrasi 0,3 ppm, 0,5 ppm dan 1 ppm tidak sesuai dengan yang dipersyaratkan. Rendahnya nilai % recovery terjadi karena metode preparasi sampel yang kurang baik sehingga diduga pengotor masih banyak terdapat dalam sampel.

## 5.6. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik, pada pengujian presisi diperoleh data sebagai berikut :

C (PPM)	Kadar (Xn)	(Xn- $\bar{x}$ )	(Xn- $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>
0,3	-0,173	0,002	0,000
0,3	-0,175	-0,175	0,031
0,3	-0,178	-0,178	0,032
<b>RATA-RATA</b>	<b>-0,175</b>	<b>JUMLAH</b>	<b>0,062</b>
		<b>SD</b>	<b>0,177</b>
		<b>RSD (%)</b>	<b>-100,610</b>
0,5	0,097	-0,001	0,000
0,5	0,098	0,098	0,010
0,5	0,099	0,099	0,010
<b>RATA-RATA</b>	<b>0,098</b>	<b>JUMLAH</b>	<b>0,019</b>
		<b>SD</b>	<b>0,098</b>
		<b>RSD (%)</b>	<b>100,330</b>
1	0,251	-0,021	0,000
1	0,287	0,287	0,082
1	0,278	0,278	0,077
<b>RATA-RATA</b>	<b>0,272</b>	<b>JUMLAH</b>	<b>0,160</b>
		<b>SD</b>	<b>0,046</b>
		<b>RSD (%)</b>	<b>104,023</b>

Tabel.V.3. Data Perhitungan Presisi

Pada pengujian dengan KCKT nilai RSD yang dipersyaratkan adalah >2%. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali pada konsentrasi 0,3 ppm, 0,5 ppm, dan 1 ppm dengan hasil simpangan baku relatif yang diperoleh adalah -100,610 %, 100,330 %, 104,023 % , dari hasil terlihat tidak memenuhi persyaratan hal ini terjadi karena masih banyaknya pengotor yang terdapat pada sampel.