

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengumpulan Sampel

Penelitian menggunakan 2 sampel sarang lebah dari spesies yang berbeda dan tempat pembudidayaan yang berbeda. Sarang lebah pertama dengan spesies *Trigona sp*, pembudidayaan di Kampung Cibeusi, Desa Palasari, Ciater, Subang, merupakan sarang lebah yang dibudidayakan di daerah hutan yang jauh dari pemukiman. Sedangkan sarang lebah kedua dengan spesies *Apis cerana*, pembudidayaan di Kampung Cikendung, Cipunagara, Subang, merupakan sarang lebah yang dibudidayakan di daerah pemukiman penduduk setempat. Tujuan digunakan kedua sampel sarang lebah dari spesies yang berbeda dan tempat pembudidayaan yang berbeda ini selain untuk mengetahui keberadaan tetrasiklin di dalam sarang lebah, digunakan juga sebagai perbandingan. Sampel yang digunakan masing-masing 5 gram dari tiap spesies dan harus selalu dalam keadaan segar.

5.2 Uji Kesesuaian Sistem

Tujuan dilakukannya uji kesesuaian sistem adalah memastikan alat yang digunakan beroperasi dengan benar, dengan syarat nilai % RSD <2 %. Dari pengujian diperoleh data sebagai berikut :

Tabel V.1 Hasil perolehan uji kesesuaian sistem

No	Waktu Retensi	Luas Area
1	2,070	3537425
2	2,070	3527865
3	2,073	3543147
4	2,067	3528328
5	2,067	3493558
6	2,070	3541368
7	2,070	3570023
Rata-rata	2,070	3534530,571
SD	0,002	22915,558
% RSD	0,100	0,648

Hasil dari perhitungan nilai % RSD dalam penelitian ini adalah 0,648 %, hal ini menunjukkan sistem alat yang bekerja memenuhi syarat.

5.3 Preparasi Sampel

Sebelum dianalisis terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel sarang lebah dengan cara sentrifugasi, ekstraksi cair-cair (ECC) dan *solid phase extraction* (SPE), tujuan dilakukan ekstraksi untuk memisahkan analit dari komponen matriks yang mengganggu.

Sampel ditambahkan 20 ml buffer sitrat dan 2 ml asam trikloroasetat (TCA), kemudian diaduk dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Penggunaan buffer sitrat bertujuan untuk mempertahankan tetrasiklin agar tidak rusak dan tetap stabil, selain itu sebagai agen pengkhelat agar mencegah senyawa logam untuk terikat pada bagian adsorpsi dalam SPE

sehingga meningkatkan efisiensi kemurnian tetrasiklin. Sedangkan TCA digunakan untuk pemisahan protein dengan mekanisme pemutusan jembatan garam pada protein dan ikatan hidrogen di dalam sarang lebah agar terjadi deproteinasi. Setelah sampel digabung dengan buffer sitrat dan TCA, dilakukan pengadukan selama 1 menit agar semua teraduk rata, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan senyawa tetrasiklin dari matriksnya. Prinsipnya yakni dengan meletakkan sampel pada suatu gaya dengan memutar sampel pada kecepatan tinggi, sehingga terjadi pengendapan partikel, atau organel-organel sel berdasarkan bobot molekulnya. Substansi yang lebih berat akan berada di dasar (pelet), sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas (supernatan). Bagian supernatan diambil untuk selanjutnya dilakukan proses ekstraksi cair-cair (ECC).

Ekstraksi cair-cair dilakukan dengan menggunakan n-heksana sebanyak 30 ml selama 5 menit yang dilakukan sebanyak 3 kali. Tujuan dilakukan ECC sebanyak 3 kali, agar filtrat yang dihasilkan lebih murni. Prinsip dari ECC adalah suatu zat akan tertarik dengan zat yang memiliki kepolaran yang sama, dimana tetrasiklin merupakan zat yang memiliki sifat semipolar sedangkan n-heksana merupakan zat dengan sifat nonpolar. n-heksana digunakan dengan tujuan menarik komponen nonpolar yang ada di dalam sampel agar terjadi perpisahan komponen antar dua cairan yang tidak saling bercampur. Terdapat 2 bagian hasil dari ECC yaitu bagian atas dan bagian bawah. Bagian atas merupakan n-heksana dan bagian bawah adalah bagian campuran buffer sitrat pH 4. Bagian bawah menunjukkan bagian dengan berat jenis yang lebih besar, n-heksana memiliki

berat jenis yang lebih kecil dibandingkan berat jenis buffer. Bagian yang diambil adalah bagian bawah karena senyawa tetrasiklin berada dalam campuran buffer sitrat pH 4. Tetrasiklin merupakan senyawa semipolar yang stabil di dalam larutan asam.

Setelah dilakukan ekstraksi cair-cair kemudian dilakukan *Solid Phase Extraction* (SPE), dengan menggunakan kolom C-18, tujuan dilakukan ekstraksi padat cair/ (SPE) adalah untuk memisahkan pengganggu dari analit yang tidak terpisahkan pada ekstraksi cair-cair. Kolom SPE sebelumnya diaktifkan terlebih dahulu dengan menggunakan 10 ml metanol dan 10 ml aquabides. Tahap ini disebut dengan tahap pengkondisian, tujuannya adalah untuk membuat nilai pH yang sama pada penjerap. Setelah itu dimasukkan sebanyak 10 ml sampel ke dalam kolom SPE, tahapan ini disebut dengan tahap retensi, pada tahap ini sampel dialirkan pada kolom dengan tujuan menahan analit yang diinginkan sehingga senyawa pengotor terelusi terlebih dahulu. Selanjutnya kolom dicuci dengan 5 ml air yang mengandung 5% metanol (v/v). Tahap ini disebut dengan tahap pencucian, tujuannya adalah membilas atau menghilangkan komponen yang tidak tertahan oleh kolom pada tahap retensi, serta meminimalisasi terdapatnya analit yang diinginkan ikut terbilas. Terakhir adalah tahap elusi, dimana analit dielusi dengan 10 ml metanol oksalat. Hasil elusi dipipet 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml lalu diencerkan dengan larutan metanol hingga tanda batas.

Eluat yang dihasilkan dari metode SPE dan telah diencerkan selanjutnya disaring menggunakan membran filter dengan ukuran 0,45 μm untuk dianalisis dengan KCKT. Sistem yang digunakan adalah sistem fasa terbalik dimana fase

gerak bersifat lebih polar daripada fase diam. Fase gerak berupa metanol : campuran pelarut (asam oksalat 0,0025 M-asetonitril, 4:1) dengan perbandingan 90:10 dan fase diam ODS. Digunakan KCKT karena KCKT dapat memisahkan analit dari sampel dengan sensitifitas dan selektifitas yang tinggi.

5.4 Hasil Analisis Tetrasiklin dalam Sarang Lebah

Tabel V.2 Hasil identifikasi tetrasiklin dalam sampel

Nama	Waktu Retensi	Luas Area
Standar	2,093	6326212
Sampel a (spesies <i>Apis cerana</i>)	2,037	314427
Sampel b (spesies <i>Trigona sp</i>)	2,033	152178

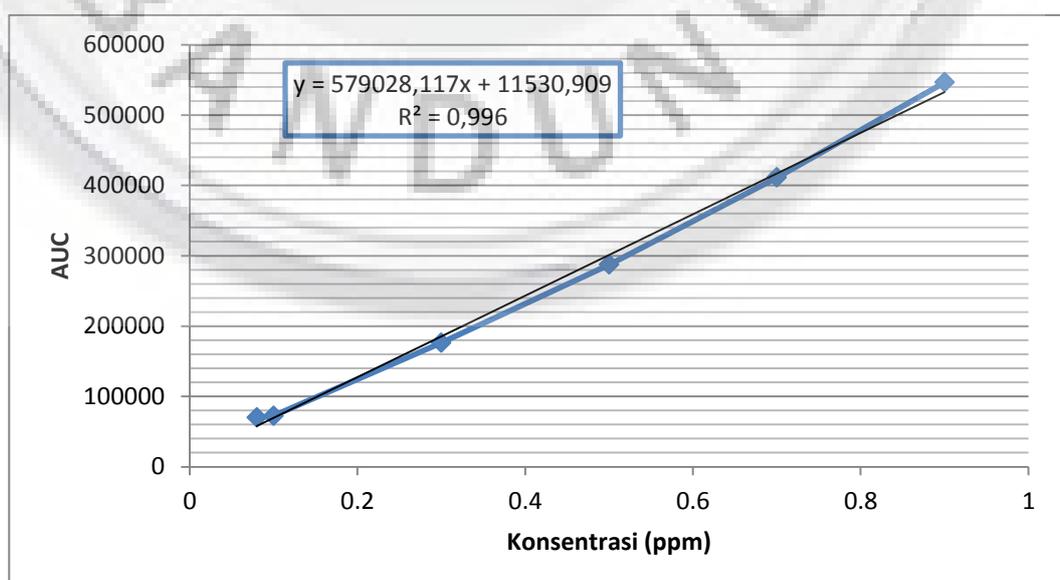
Dari tabel hasil analisis tetrasiklin dalam sampel sarang lebah dilihat dari waktu retensi yang dihasilkan sampel dibandingkan dengan waktu retensi standar baku tetrasiklin dapat disimpulkan bahwa kedua sampel yang digunakan tidak mengandung tetrasiklin (hasil negatif). Kemudian setelah dilakukan pengecekan menggunakan baku tinambah pada sampel, puncak yang dihasilkan tidak mengalami peningkatan. Hal ini membuktikan bahwa sampel tidak mengandung tetrasiklin. Sehingga kadar sampel tidak dapat ditentukan.

5.5 Validasi Metode Analisis

Validasi merupakan proses evaluasi untuk menjamin kesesuaian persyaratan metode analisis yang digunakan. Validasi yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ).

5.5.1 Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-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). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan, intersep dan koefisien korelasinya (r). Hubungan linier yang ideal dapat dicapai jika nilai r mendekati 1 (Gandjar dan Rohman, 2007 :469).



Gambar V.1 Kurva Kalibrasi

Dari kurva kalibrasi, didapat persamaan regresi linier $y = 579028,117x + 11530,909$ dan nilai r^2 yang diperoleh 0,996. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa pengujian linieritas ini memenuhi persyaratan karena nilai koefisien korelasi (r) mendekati 1.

5.5.2 Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisa dengan nilai yang sebenarnya, dan dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% *recovery*).

Tabel V.3. Data perhitungan akurasi

No.	C (Baku pembanding)	Luas Area	C (Hasil)	% Perolehan kembali
1	0,5	215175	0,352	70,40
2	0,5	207349	0,338	67,60
3	0,5	211484	0,345	69,00
			Rata-rata	69,00
4	0,8	274851	0,455	56,87
5	0,8	273073	0,452	56,50
6	0,8	267134	0,441	55,12
			Rata-rata	56,16
7	0,9	505074	0,852	94,66
8	0,9	512990	0,866	96,22
9	0,9	511200	0,863	95,89
			Rata-rata	95,59

Menurut Harmita pada tahun 2004, % perolehan kembali dari analit yang memiliki konsentrasi sekitar 1 ppm adalah 80-110 %. Dari hasil yang didapat hanya satu konsentrasi baku pembanding yang memenuhi syarat. Rendahnya nilai

persen perolehan kembali disebabkan karena proses preparasi sampel yang kurang baik sehingga ada senyawa pengotor yang masih terbawa, dan senyawa pengotor ini mengganggu hasil analisis.

5.5.3 Presisi

Presisi adalah ukuran keterulangan metode analisis dan diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (RSD).

Tabel V.4 Data nilai presisi

No.	C (Baku pembanding)	Luas Area	C (Hasil)
1	0,5	215175	0,352
2	0,5	207349	0,338
3	0,5	211484	0,345
4	0,5	215363	0,352
5	0,5	210287	0,343
6	0,5	207645	0,338
		Rata-rata	0,345
		SD	0,0063
		RSD	1,82%

Pengujian presisi dilakukan untuk melihat kedekatan antara hasil uji yang dilakukan secara berulang pada sampel. Dari hasil perhitungan nilai RSD yang di dapatkan memenuhi syarat, karena menurut Harmita pada tahun 2004 untuk sampel makanan persyaratan nilai RSD adalah ≤ 16 %. Sehingga dapat disimpulkan bahwa perolehan nilai perolehan kembali memenuhi syarat.

5.5.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi (LOD) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat di deteksi.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} = \frac{3 \times 12683,199}{579028,117} = 0,0657 \text{ ppm}$$

Batas kuantifikasi (LOQ) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi oprasional metode yang digunakan.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} = \frac{10 \times 12683,199}{579028,117} = 0,2192 \text{ ppm}$$