

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengambilan Sampel

Dalam penelitian ini, pengambilan lima sampel yang dilakukan dengan cara memilih madu impor berasal Jerman, Austria, China, Australia, dan Swiss yang dijual di salah satu supermarket di Kota Bandung.

5.2 Persiapan Sampel

Persiapan sampel pada penelitian residu antibiotik Tetrasiklin, yang pertama kali dilakukan, sampel madu diekstraksi, tujuan dari ekstraksi untuk mendapatkan analit yang mengandung tetrasiklin yang efektif dan efisien untuk dapat dianalisis. Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi cair – cair, dimana terjadi distribusi zat pelarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi cair- cair yaitu etil asetat dan air (8:2). Kemudian madu didalam corong pisah dikocok secara teratur selama 10 menit, setelah itu didiamkan hingga larutan membentuk dua lapisan. Etil asetat terdapat dilapisan atas karena memiliki berat jenis yang lebih rendah yaitu 0,897 g/ml dibandingkan dengan air yang memiliki berat jenis 1 g/ml.

Dari proses ekstraksi cair – cair, bagian yang digunakan untuk proses selanjutnya adalah etil asetat, karena tetrasiklin dapat larut dalam pelarut organik tersebut. Setelah itu larutan etil asetat dipisahkan dengan menggunakan waterbath dengan suhu 70°C. Tujuan dari pemekatan untuk menghilangkan pelarut organik.

Sampel yang telah pekat ditotolkan pada plat KLT GF 245 yang sebelumnya telah diaktivasi selama 10 sampai 15 menit pada suhu 105°C. tujuan dari aktivasi tersebut untuk menghilangkan kandungan air yang terdapat pada plat tersebut. Dielusi dengan menggunakan eluen kloroform dan metanol (9:1). Sebelumnya dilakukan penjenuhan eluen, tujuannya untuk mendapatkan eluen yang optimum pada saat proses elusi.

Hasil sampel kromatografi lapis tipis (KLT) yang telah di elusi dengan larutan pengembang kloroform – metanol, disajikan pada Lampiran 2. Hasil KLT tersebut kemudian dikerok dan dilarutkan dalam pelarut metanol sebanyak 10 mL disaring dengan membran filter 0,45 μm . Selanjutnya sampel siap di analisis dengan menggunakan KCKT.

5.3 Orientasi Fase Gerak

Sebelum melakukan analisis terhadap Tetrasiklin dengan menggunakan KCKT dilakukan orientasi fase gerak untuk mendapatkan perbandingan yang baik. Orientasi fase gerak menggunakan larutan metanol – asetonitril – asam oksalat 0,01M dengan perbandingan yang berbeda-beda, yaitu, 65:15:20, 69:16:15 dan 73:17:10. Dari ketiga perbandingan tersebut, dipilih perbandingan 73:17:10 karena dilihat dari puncak pada kromatogram yang lancip dengan waktu retensi 2,130 sehingga waktu analisis lebih efisien.

5.4 Analisis Tetrasiklin pada Madu dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Metode analisis residu antibiotik golongan tetrasiklin dalam madu secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Analisis ini menggunakan KCKT Agilent 1220 dengan detektor UV dengan panjang gelombang 355 nm. Kolom yang digunakan yaitu Oktadesil silica (ODS atau C18) merupakan fase balik karena sifat dari fase gerak lebih polar dibandingkan dengan sifat kolom, sehingga larutan yang lebih polar akan lebih cepat keluar, sedangkan yang bersifat non polar akan lebih lama tertahan di dalam kolom.

Fase gerak yang digunakan menggunakan perbandingan metanol – asetonitril – asam oksalat (73:17:10). Metanol dan asetonitril merupakan pelarut yang bersifat semi polar sedangkan asam oksalat bersifat polar. Tetrasiklin akan lebih larut dalam pelarut organik yang bersifat semi polar, sehingga tetrasiklin akan tertahan lebih lama pada kolom C18 sedangkan analit yang bersifat polar akan lebih cepat keluar dari kolom.

5.5 Uji Kesesuaian Sistem

Tujuan dilakukan uji kesesuaian sistem adalah untuk melihat sistem kromatografi beroperasi secara baik atau tidak. Dilakukan penyuntikan sebanyak 7 kali dengan larutan standar Tetrasiklin pada konsentrasi 1 ppm dalam alat KCKT pada kondisi optimum. Dari kromatogram yang diperoleh dapat dilihat dari nilai luas area dan waktu retensi. Dihitung nilai simpangan baku residual (SBR)

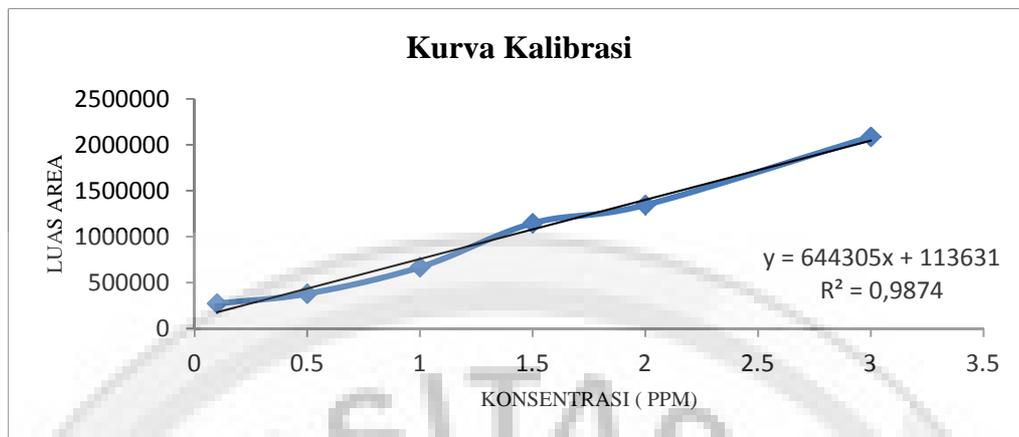
diperoleh luas area 1,93% dan waktu retensi sebesar 0,11%. Hasil tersebut memenuhi syarat, karena nilai SBR yang baik yaitu $\leq 2\%$.

5.6 Verifikasi Metode

Tujuan dari verifikasi metode adalah untuk membuktikan suatu metode yang digunakan mampu melakukan pengujian dengan hasil yang valid. sehingga dapat memberikan kepastian bahwa metode tersebut masih memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Parameter analisis yang digunakan meliputi linieritas, akurasi dan presisi.

5.6.1 Linieritas

Uji linieritas bertujuan untuk mengetahui apakah dua variabel mempunyai hubungan yang linier atau tidak secara signifikan. Untuk mendapatkan persamaan regresi dibuat kurva kalibrasi dengan berbagai macam konsentrasi yaitu 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 ppm. Didapat luas area dari masing-masing konsentrasi dan dibuat persamaan garis lurus (*regresi linier*) $y = bx + a$, $y = 644305x + 113631$ dengan nilai koefisien korelasi (r) 0.993 dan nilai V_{x0} sebesar 9,86 %. Sehingga dapat disimpulkan bahwa nilai koefisien korelasi memenuhi syarat karena mendekati nilai 1, sedangkan V_{x0} tidak memenuhi syarat karena lebih dari 5%.



Gambar 5.1 Kurva Kalibrasi

5.6.2 Akurasi dan presisi

Dari hasil akurasi yang diperoleh nilai persen perolehan kembali dari masing- masing konsentrasi sebesar 19,48% pada konsentrasi 1 ppm, 22,93% pada konsentrasi 1,5 , dan 39,21% pada konsentrasi 2. Dapat disimpulkan dari ketiga konsentrasi tersebut nilai perolehan kembali tidak akurasi karena tidak masuk dalam rentang yaitu antara 98-102 %. Hasil dari akurasi data dilihat pada Tabel 4.1.

C (ppm)	Luas Area (std+sampel)	Luas Area Sampel	Luas Area Standar	Kadar (X)	% Rec
1	820084	580775	239309	0,195	19,51
1	820440	580775	239665	0,196	19,56
1	819262	580775	238487	0,194	19,38
1.5	903918	580775	323143	0,325	21,68
1.5	919173	580775	338398	0,349	23,26
1.5	923867	580775	343092	0,356	23,74
2	1189420	580775	608645	0,768	38,41
2	1200753	580775	619978	0,786	39,29
2	1209093	580775	628318	0,799	39,94

Tabel 5.1 Perhitungan Akurasi

Dari hasil presisi dapat disimpulkan bahwa pada 1 ppm didapat nilai SBR 0,513 %, 1,5 ppm 5,83 %, dan 2 ppm 1,97 %. Hasil tersebut tidak memenuhi syarat karena SBR yang baik adalah $\leq 2\%$.

Hasil yang diperoleh tidak akurat dan presisi disebabkan karena pada tahapan preparasi yang kurang baik. Pada saat proses pemekatan di waterbath kemungkinan sampel ikut menguap bersama pelarut, sehingga kadar tetrasiklin dalam sampel semakin berkurang. Selain dari proses pemekatan, kadar tetrasiklin juga dapat berkurang pada proses kromatografi disaat tahap pengerokan yang tidak merata pengambilannya sehingga analit diduga masih terdapat pada plat KLT. Hasil dari presisi dapat dilihat dari Tabel 4.2.

C (PPM)	kadar (Xn)	(Xn- \bar{x})	(Xn- \bar{x}) ²
1	0,195	0	0
1	0,196	0,001	0,000001
1	0,194	-0,001	0,000001
rata - rata	0,195	Jumlah	0,000002
		SD	0,001
		SBR	0,513
1.5	0,325	-0,018	0,000324
1.5	0,349	0,006	0,000036
1.5	0,356	0,013	0,000179
rata - rata	0,343	Jumlah	0,000539
		SD	0,02
		SBR	5,83
2	0,768	-0,016	0,000256
2	0,786	0,002	0,000004
2	0,799	0,015	0,000225
rata - rata	0,784	Jumlah	0,000485
		SD	0,0155
		SBR	1,97

Tabel 5.2 Perhitungan Presisi

Metode yang digunakan pada akurasi dan presisi adalah metode standar adisi (baku tinambah). Digunakan metode adisi karena sampel yang akan dianalisis tidak diketahui komposisinya, sehingga ditambahkan standar pada konsentrasi yang meningkat secara teratur. Metode adisi ini sangat membantu terutama untuk analisa senyawa yang kadarnya kecil.

5.6.3 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) adalah nilai parameter uji batas, yaitu konsentrasi analit terendah yang masih terdeteksi. Hasil LOD yang diperoleh yaitu 0,40 ppm. Batas kuantitasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Hasil LOQ yang diperoleh yaitu 1,33 ppm. Apabila hasil kadar analisis tidak masuk pada rentang LOD dan LOQ maka dapat disimpulkan kadar tersebut tidak masuk syarat tersebut.

5.7 Hasil analisis Tetrasiklin pada madu

Dari kelima sampel yang dianalisis hanya dua sampel madu yang berasal dari Jerman dan Austria yang dapat diidentifikasi karena tiga sampel lainnya tidak memberikan serapan pada plat KLT sehingga tidak dapat dilanjutkan pada tahapan analisis KCKT. Berikut hasil identifikasi kadar tetrasiklin dalam sampel madu yang dapat dilihat pada tabel 4.3.

Nama Sampel	Waktu Retensi (menit)	Luas Area	Hasil (+/-)
Sampel 1	2,173	580775	+
Sampel 2	2,143	3217934	+
Sampel 3	-	-	-
Sampel 4	-	-	-
Sampel 5	-	-	-

Keterangan : (+) = terdeteksi (-) = tidak terdeteksi

Tabel 5.3 Kadar Tetrasiklin dalam Sampel Madu

Dari hasil identifikasi kadar tetrasiklin dalam tabel diatas, dapat disimpulkan secara kualitatif bahwa pada kedua sampel tersebut positif mengandung tetrasiklin, karena dilihat dari waktu retensi sampel dibandingkan dengan waktu retensi standar (tetrasiklin). Waktu retensi pada masing – masing sampel 2,143 dan 2,173 sedangkan pada standar 2,122. Sehingga waktu retensi sampel berada pada rentang waktu retensi standar dengan luas area yang berbeda.