

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Residu Tetrasiklin dalam Telur Ayam Organik dan Non-Organik Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Ayu Damarani¹⁾, Nety Kurniaty²⁾, dan Diar Herawati³⁾

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Islam Bandung, Jl. Ranggagading No. 8 Bandung
e-mail: ayudamarani@gmail.com¹⁾; netykurniaty@yahoo.com²⁾; diarmunawar@gmail.com³⁾

Abstrak

Telah dilakukan analisis residu antibiotik golongan tetrasiklin pada telur ayam secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Metode penelitian ini meliputi proses preparasi sampel dengan pelarut TCA (asam trikloroasetat) 20% dan penambahan buffer sitrat pH 4 diikuti dengan proses sentrifugasi serta ekstraksi cair-cair menggunakan n-heksan. Setelah itu dilakukan pemurnian dengan Solid Phase Extraction (SPE) menggunakan cartridge C18. Selanjutnya sampel yang telah dipreparasi, dianalisis menggunakan KCKT dengan fase gerak metanol, dan campuran pelarut (asam oksalat 0,0025 M:asetonitril, 4:1) 90:10, dengan fase diam berupa kolom C18 serta detektor UV pada panjang gelombang 355 nm. Hasil analisis menunjukkan bahwa dari sampel A (telur non-organik) dan sampel B (telur organik) positif mengandung tetrasiklin. Hasil validasi menunjukkan bahwa kurva kalibrasi menghasilkan linearitas yang baik dengan koefisien korelasi mendekati 1 ($r^2 = 0,996$). Akurasi berada pada rentang 40-54% hasil ini tidak memenuhi persyaratan akurasi yaitu berada pada rentang 80-110%. Sedangkan nilai presisi yang dihasilkan dibawah 16%. Untuk nilai batas deteksi (LOD) ditemukan berada pada rentang 0,01 ppm dan batas kuantifikasi (LOQ) berada pada rentang 0,03 ppm. Nilai analit yang dihasilkan dibawah nilai LOQ sehingga kadarnya tidak dapat ditentukan secara kuantitatif.

Kata Kunci: telur ayam, tetrasiklin, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

1. Pendahuluan

Di seluruh dunia hampir sebagian besar hewan ternak yang digunakan sebagai menu utama produk makanan hewani adalah ayam. Baik daging, telur, kulit bahkan organ dalamnya diolah, dan dikonsumsi oleh manusia. Banyak peternakan hewan yang membudidayakan ayam untuk diperjualbelikan kepada masyarakat melalui pasar tradisional maupun supermarket. Telur merupakan salah satu produk yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat dari berbagai kalangan, dan memiliki banyak nutrisi penting bagi manusia salah satunya adalah protein.

Pada umumnya antibiotik seperti tetrasiklin digunakan untuk mengobati penyakit pada unggas sehingga kualitas dari produk yang dihasilkannya terjaga. Namun penggunaan antibiotik ke dalam pakan hewan ternak tanpa dosis yang tepat dapat menyebabkan timbulnya residu di dalam jaringan dan mengakibatkan terjadinya resistensi bakteri. Antibiotik tetrasiklin mampu terakumulasi di dalam jaringan dan memiliki tingkat distribusi yang tinggi pada jaringan otot. Pada ayam petelur, tetrasiklin dapat terdistribusi dalam ovarium dengan folikel yang sedang berkembang dimana terjadi sekresi putih telur. Dengan pemaparan tetrasiklin yang tinggi, tetrasiklin tidak diragukan lagi memiliki kontribusi resistensi sangat luas terhadap hewan serta manusia pada bakteri *Enterobacteriaceae* dan bakteri patogen lainnya. Pada tahun 2010 berdasarkan Jurnal hasil Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner di Bogor, telah terbukti terdapat sejumlah residu tetrasiklin dalam daging ayam, sehingga ada kemungkinan terdapat resiko akumulasi residu tetrasiklin di dalam telur yang dihasilkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar tetrasiklin dalam telur menggunakan metode pemisahan sentrifugasi serta ekstraksi cair-cair yang dimurnikan dengan ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction*, SPE) dan dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi berdasarkan penelitian dalam *Food Chemistry Journal: Validation of HPLC method for determination*

of tetracycline residues in chicken meat and livery yang dilakukan oleh Shalaby et al., pada tahun 2011 dan penelitian yang dilakukan oleh Hendy A.P. pada tahun 2015 dalam skripsinya yang berjudul 'Analisis Residu Golongan Tetrasiklin Pada Hati Ayam Di kawasan Coblong Kota Bandung Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi'. Oleh karena itu diharapkan dapat memberikan manfaat serta informasi kepada masyarakat dalam mengkonsumsi serta memilih telur.

1.1. Tetrasiklin

Menurut Gunawan dkk. Pada buku Farmakologi dan Terapan edisi 5 tahun 2007, tetrasiklin merupakan senyawa basa yang sukar larut dalam air, tetapi dalam bentuk garamnya tetrasiklin mudah larut dalam air. Pada bentuk tersebut dalam keadaan kering, tetrasiklin relatif lebih stabil dibandingkan dalam bentuk larutan atau cairan. Tetrasiklin mempunyai sifat bakteriostatik dengan mekanisme kerja menghambat sintesis protein dengan cara, antibiotik masuk melalui difusi pasif dan transport aktif kemudian berikatan secara reversibel dengan ribosom 30s sehingga tidak terjadi perpanjangan rantai polipeptida. Walaupun bersifat bakteriostatik akan tetapi tetrasiklin mempunyai spektrum luas terhadap bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif, aerobik serta anaerobik.

Berdasarkan proses farmakokinetiknya, tetrasiklin mampu diabsorpsi sebanyak 30-80% melalui saluran cerna, namun proses absorpsi dapat dihambat oleh berbagai faktor seperti adanya makanan dalam lambung, pH, terjadi reaksi kompleks dengan beberapa senyawa logam yang sukar diserap dan biasanya ada dalam susu. Oleh karena itu penggunaan tetrasiklin diberikan sebelum atau 2 jam setelah makan. Sebagian besar golongan tetrasiklin dalam darah terikat pada protein plasma, dan mampu terakumulasi dalam hati, jaringan limpa, sumsum tulang, area dentin dan email gigi serta dapat melewati sawar urin sehingga kandungan tetrasiklin pada air susu ibu cukup tinggi. Pengeluaran atau proses eliminasi tetrasiklin terjadi di ginjal melalui mekanisme filtrasi glomerulus dan dikeluarkan melalui urin.

Tetrasiklin adalah antibiotik yang paling sering digunakan dalam kedokteran hewan, merupakan pilihan pertama penggunaan obat pada makanan hewan, termasuk spesies budidaya binatang air, hewan hias dan madu. Akan tetapi penggunaannya pada binatang peliharaan, kuda, dan manusia lebih rendah. Pada hewan unggas, umumnya tetrasiklin digunakan untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Chlamydophylosis*, *Mycoplasma gallisepticum* (penyakit kronis pernafasan), *Mycoplasma synoviae*, *Pastereulla multocida* (penyakit kolera) (Giguère et al., 2013:266).

Menurut WHO dalam CODEX pada tahun 2006 menetapkan batas maksimum residu (BMR) total untuk residu tetrasiklin pada produk unggas adalah 200 ng/g untuk daging, 600 ng/g untuk hati, 1200 ng/g untuk ginjal dan 400 ng/g untuk telur. Sedangkan di Indonesia Dewan Standarisasi Nasional pada tahun 2000 menetapkan BMR untuk residu tetrasiklin dalam daging adalah 100 ng/g dan dalam susu 50 ng/g serta untuk residu klortetrasiklin dalam daging adalah 100 ng/g, dalam telur 10 ng/g, dan 50 ng/g untuk susu.

1.2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), adalah teknik yang mempunyai prinsip suatu fase gerak cair dipompa dibawah tekanan melalui kolom baja yang mengandung partikel-partikel fase diam. Analit tersebut dimasukkan ke dalam bagian atas kolom melalui katup lengkung dan pemisahan suatu campuran berlangsung sesuai dengan lamanya waktu relatif yang dibutuhkan komponennya di dalam fase diam. Pemantauan eluen kolom dapat dilakukan dengan berbagai detektor (Watson, 2009:314).

Terdapat dua mekanisme penting yang menyebabkan penahanan suatu senyawa melewati kolom. Kedua mekanisme ini untuk gel silika yang merupakan pengemas fase normal dengan mekanisme penahanan melalui adsorpsi gugus polar suatu molekul pada gugus polar fase diam. Silika gel tersalut-ODS (oktadesilsilen) termasuk ke dalam pengemas fase balik dengan mekanisme penahanan akibat partisi bagian lipofilik suatu molekul dalam fase diam. Sebagian besar senyawa akan tertahan tergantung pada polaritasnya pada silika gel dan terutama lipofilisitasnya dalam hal pengemas fase balik seperti silika gel-ODS. Sebagian besar molekul obat memiliki gugus polar dan lipofilik. Faktor lain yang perlu dipertimbangkan berkaitan dengan tingkat retensi senyawa, adalah

sifat fase gerak. Semakin polar suatu fase gerak, maka akan semakin cepat fase tersebut mengelusi senyawa dari kolom silika gel dan semakin lipofilik suatu fase gerak, semakin cepat fase tersebut akan mengelusi senyawa dari kolom fase balik (Watson, 2009:316-317).

2. Materi dan Metode

2.1. Materi

Alat-alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo), instrumen KCKT (Agilent 1220) dengan detektor UV pada panjang gelombang 355 nm dan menggunakan kolom C18 (Zorbax® 250 x 4,6 mm), kolom SPE dengan *cartridge* C18 (200 mg 3 ml standar, Phenomenex Strata®), pH meter (Mettler Toledo, seven compact 5220-k) serta alat sentrifugasi (80-2 Sentrifuga). Asam trikloroasetat (TCA), asam sitrat, natrium sitrat, buffer sitrat pH 4, n-heksan dan asam oksalat. Asetonitril dan metanol dengan *grade pro HPLC*, membran filter 0,45 µm (Agilent), tetrasiklin, aquadest, dan aquabidest serta sampel telur.

2.2. Metode Penelitian

Sampel telur dideproteinisasi menggunakan larutan TCA (asam trikloroasetat) 20%, dan penambahan larutan dapar sitrat pH 4. Kemudian disentrifugasi untuk memisahkan antara supernatant dengan pelet (residu). Setelah itu dilakukan ekstraksi cair-cair menggunakan n-heksan sebagai pelarut non-polar. Filtrat yang dihasilkan dimurnikan menggunakan SPE dengan *cartridge* C18, sampel elusi dengan metanol yang mengandung 0,01 M asam oksalat. Hasil elusi difiltrasi kembali menggunakan membran filter 0,45 µm. Sampel yang telah murni, dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan system kromatografi fase terbalik dimana fase diamnya berupa kolom C18 dan fase geraknya berupa methanol dan campuran pelarut (asam oksalat 0,0025 M:asetonitril, 4:1) 90:10, dengan menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 355 nm. Sebelum analisis dilakukan, terlebih dahulu dilakukan validasi metode analisis yang akan digunakan. Parameter yang diujikan meliputi akurasi, presisi, linearitas, batas deteksi, dan batas kuantifikasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Metode yang dilakukan pada penelitian ini meliputi pemisahan protein pada sampel telur menggunakan 2 ml asam trikloroasetat 20% dan penambahan buffer sitrat pH 4 untuk menjaga kestabilan senyawa tetrasiklin yang terdapat dalam sampel dan sebagai agen pengkelat untuk mencegah senyawa logam terikat pada bagian adsorpsi *Solid Phase Extraction* (SPE) dalam meningkatkan efisiensi kemurnian tetrasiklin. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan protein yang telah terdenaturasi oleh asam berdasarkan berat molekulnya. Protein dengan berat molekul yang tinggi dapat cepat mengendap di dasar tabung.

Setelah itu dilakukan ekstraksi cair-cair (ECC) dengan prinsip pemisahan senyawa berdasarkan kelarutan analit dalam pelarut. ECC ini dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan pengotor yang bersifat non-polar pada sampel, sehingga digunakan pelarut n-heksan. Pada proses ECC terbentuk dua lapisan yang saling tidak bercampur antara bagian air asam yang berisi campuran buffer sitrat pH 4 dan asam trikloroasetat serta lapisan pelarut organik n-heksan. Filtrat yang diambil adalah filtrate pada bagian air asam karena tetrasiklin larut dalam asam dan sangat sukar larut dalam pelarut non-polar karena sifatnya yang merupakan senyawa semi-polar. Hal ini dilakukan secara 3 kali berturut-turut agar pelarut tidak jenuh dan filtrat yang dihasilkan lebih murni.

Kemudian filtrat diuapkan dalam penangas air hingga 8 ml, hal ini dilakukan untuk menguapkan senyawa-senyawa pengotor yang mudah menguap dalam sampel serta untuk memudahkan dalam proses pemurnian menggunakan SPE. SPE memiliki mekanisme pemisahan senyawa secara adsorpsi dimana pada proses pemurnian menggunakan SPE dilakukan melalui 4 tahap yaitu:

1. Pengkondisian

Pada tahap ini *cartridge* (penjerap) pada SPE dikondisikan dengan dialiri 10 ml metanol dan 10 ml aquabidest untuk membasahi permukaan penjerap dan untuk menciptakan nilai pH yang sama, sehingga perubahan-perubahan kimia yang tidak diharapkan ketika sampel dimasukkan dapat dihindari.

2. Retensi (tertahannya sampel)

8 ml sampel dialirkan ke dalam *cartridge* untuk menahan analit yang diinginkan, sementara komponen senyawa lain atau pengotor untuk terelusi terlebih dahulu. Pada tahap ini hasil menunjukkan bahwa, larutan yang terelusi terlebih dahulu berwarna keruh sedangkan pada bagian *cartridge* berwarna kuning cerah yang artinya senyawa tetrasiklin berhasil terjerap. Berdasarkan Farmakope Indonesia edisi IV salah satu pemerian tetrasiklin, merupakan senyawa yang berwarna kuning.

3. Pembilasan/Pencucian

Pada tahap ini dilakukan dengan mengalirkan 10 ml metanol 5% dalam air dengan tujuan untuk menghilangkan seluruh komponen yang tidak tertahan oleh *cartridge* selama tahap retensi. Selain itu penggunaan 10 ml metanol 5% dalam air juga bertujuan untuk meminimalkan terbilasnya analit yang diinginkan.

4. Elusi

Pada tahap ini dilakukan dengan mengalirkan 10 ml 0,01 M metanol-oksalat untuk mengelusi analit yang terjerap pada *cartridge*. Pada dasarnya elusi tetrasiklin dari penjerap fasa balik itu sulit karena tetrasiklin merupakan senyawa amfoter dan memiliki lebih dari satu atom nitrogen. Oleh karena itu dilakukan dengan volume elusi yang besar.

Filtrat yang dihasilkan diencerkan dalam metanol kemudian di saring menggunakan membran filter 0,45 μm dan diinjeksikan ke dalam kromatografi cair kinerja tinggi dengan sistem fase terbalik, menggunakan fase diam C18 serta campuran pelarut (asam oksalat 0,0025M:asetonitril, 4:1) 90:10 dengan elusi isokratik. Kromatografi ini termasuk salah satu jenis kromatografi cair-cair dimana fase diamnya adalah cairan yang disangga oleh silika serta, memiliki mekanisme pemisahan secara partisi. Pada umumnya KCKT memiliki prinsip pemisahan dimana sampel akan terdistribusi diantara dua fase yaitu fase diam, dan fase gerak yang dibantu dengan pompa bertekanan tinggi. Analisis menggunakan KCKT memiliki beberapa kelebihan yaitu mampu memisahkan analit dalam sampel dengan selektivitas dan sensitivitas yang tinggi dengan pemilihan kolom, sistem, dan fase gerak yang baik sesuai dengan jenis analit yang akan dipisahkan. Pemilihan kolom C18 didasarkan pada sifat tetrasiklin yang merupakan semi polar. Dengan sifat kolom C18 yang lebih non polar dibandingkan fase geraknya, tetrasiklin akan terlebih dahulu terelusi oleh fasa gerak yang bersifat lebih polar dan senyawa pengotor dengan sifat lebih non polar akan tertahan lebih lama pada fasa diam.

Hasil menunjukkan bahwa sampel A (telur non-organik) dan sampel B (telur organik) positif mengandung tetrasiklin dengan waktu retensi 2,113 menit dan 2,120 menit. Berdasarkan hasil orientasi terhadap sampel yang digunakan dengan penambahan larutan pembanding tetrasiklin, luas area pada ke dua sampel meningkat, hal ini membuktikan bahwa ke dua sampel mengandung tetrasiklin namun kadarnya tidak dapat ditentukan secara kuantitatif karena hasil validasi metode memberikan nilai dibawah angka batas kuantifikasi (LOQ) yang diperoleh yaitu 0,03 ppm. Sedangkan untuk parameter linearitas, batas deteksi (LOD) dan presisi, nilai yang dihasilkan telah memenuhi syarat. Namun untuk akurasi, % perolehan kembali yang dihasilkan tidak memenuhi persyaratan, hal ini disebabkan masih terdapat banyak pengotor dalam sampel sehingga mengganggu analisis serta adanya analit yang terbuang pada saat proses pemisahan.

Tabel 1. Sampel A (telur non-organik) dan Sampel B (telur organik)

Sampel	Analisis Kualitatif	
	Waktu Retensi	Luas Area
A (telur non-organik)	2,113 menit	15258
B (telur organik)	2,120 menit	20024

Tabel 2. Hasil Validasi

Validasi	Parameter	Nilai hasil Perhitungan	Syarat
Akurasi	% Perolehan Kembali	40-58%	80-110%
Presisi	Relatif Standar Deviasi (RSD)	5,722	<16%
Linieritas	Koefisien Korelasi	0,996	Mendekati 1
Batas Deteksi (LOD)	Dapat terdeteksi	0,01 ppm	Kadar hasil perhitungan sampel harus diatas nilai LOD dan LOQ
Batas Kuantifikasi (LOQ)	Dapat ditentukan kadar senyawanya secara kuantitatif	0,03 ppm	

4. Kesimpulan

Pada sampel A (telur non-organik) dan sampel B (telur organik) terdeteksi adanya senyawa tetrasiklin, tetapi tidak dapat dinyatakan secara kuantitatif karena nilai kadar dibawah LOQ. Hasil validasi dari metode analisis yang digunakan menunjukkan bahwa nilai akurasi yaitu 49% (0,1 ppm) dan 30% (0,11 ppm), serta nilai LOQ, tidak memenuhi persyaratan.

Daftar Pustaka

- Cinquina, A. L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., Cozzani, R. 2003. 'Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle', *Journal of Chromatography A*, 987, 227-233.
- CODEX 2006. MRLs for Veterinary Drugs in Foods. 26th Session of the Codex Alimentarius Commission. p. 4.
- Diah, N. 2013. *Analisis Residu Antibiotik Tetrasiklin Pada Madu Yang Beredar Di Wilayah Bandung Dengan Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)* [Skripsi], Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung.
- Gunawan S.G., Nafrialdi R.S., Elysabeth. 2007. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi 5, Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Giguère, Steeve., Prescott, John F., Dowling, Patricia M. 2013. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Fifth Edition*. Published by John Wiley & Sons, Inc.
- Hendi, A.P. 2015. *Analisis Residu Golongan Tetrasiklin Pada Hati Ayam Dikawasan Cobleng Kota Bandung Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi* [Skripsi], Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung.
- Gomori, G. 1955. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies, *Methods in Enzymology Journal*, Vol. 1, 16.
- Gandjar, I.G., Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Harmita. 2004. 'Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya', *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 3 Desember, Vol. 1, 117-135.
- Katzung, Bertram G. 2010. *Buku Farmakologi Dasar dan Klinik*. Penerbit EGC, Jakarta.

- Rohman, A. 2009. *Kromatografi Untuk Analisis Obat*. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Sweetman, S.C. 2009. *Martidale :The Complete Drug Reference 36*. Pharmaceutical Press, London, Chicago.
- Shalaby, A.R., Salama, N.A., Abou-Raya, S.H., Emam, W.H., Mehaya, F.M. (2011). 'Analytical Method : Validation of HPLC method for determination of Tetracycline residues in chicken meat and liver', *Food Chemistry Journal*, 18th July, 124, 1660-1666.
- Simpson, Nigel J.K. 2000. *Solid-Phase Extraction : Principles, Techniques, and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Thurman, E.M., Mills, M.S. 1998. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practices*, Vol. 147. John Wiley & Sons, Inc.
- Tjay, T. Hoan, dan Rahardja, Kirana. 2007. *OBAT-OBAT PENTING: Khasiat, Penggunaan, dan Efek Sampingnya*, Edisi 6, Penerbit PT. Elex Media Komputindo, Gramedia, Jakarta.
- Watson, D.G. 2009. *Analisis Farmasi*, Edisi 2, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Widiastuti, R., Murdiati, T.B., dan Anastasia, Y. 2010. *Residu Tetrasiklin Pada Daging Ayam Pedaging Dari Wilayah Jakarta, Depok, Dan Bekasi Yang Dideteksi Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*, Dokumen dipresentasikan di Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor.
- .Diunduh pada 11 Oktober 2007.

