

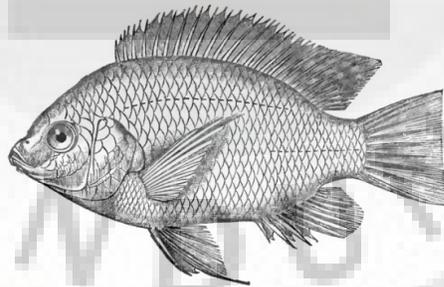
BAB I

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Ikan Nila

Klasifikasi ikan nila menurut Trewavas (1982), sebagai berikut :

| | |
|------------|--------------------------------|
| Kerajaan | : Animalia . |
| Filum | : Chordata |
| Sub filum | : Vertebrata. |
| Kelas | : Osteichtyes |
| Anak kelas | : Acanthopterygii |
| Bangsa | : Percomorphy |
| Suku | : Cichlidae |
| Marga | : <i>Oreochromis</i> |
| Jenis | : <i>Oreochromis niloticus</i> |



Gambar I.1 Ikan Nila

1.2 Bahaya Dalam Keamanan Pangan

Secara garis besar, bahaya yang terdapat pada pangan digolongkan dalam tiga jenis, yaitu bahaya fisik, bahaya kimia, dan bahaya biologis, yang bila dikonsumsi manusia, dapat menimbulkan gangguan terhadap kesehatan. Bahaya

tersebut dapat terjadi melalui berbagai cara yaitu dari pekerja, makanan, peralatan, proses pembersihan dan dari rambut, kuku, perhiasan, serangga mati, batu atau kerikil, potongan ranting atau kayu, pecahan gelas atau kaca, potongan plastik dan potongan kaleng yang dapat mencederai secara fisik. Benda asing lainnya dapat menjadi pembawa mikroba berbahaya ke dalam pangan dan menyebabkan keracunan pangan (POM, 2009).

Bahaya fisik dapat terjadi apabila pangan dijual di tempat terbuka dan tidak disimpan dalam wadah tertutup, penjual mengenakan perhiasan tangan, dan penjual menangani makanan dan bahan pangan dengan ceroboh (POM, 2009).

Bahaya mikrobiologi dapat disebabkan oleh mikroba dan binatang. Mikroba lebih sering menyebabkan keracunan pangan dibandingkan bahan kimia (termasuk racun alami) dan bahan asing (cemaran fisik). Sebagian mikroba tersebut tidak berbahaya dan bahkan beberapa di antaranya dapat digunakan untuk membuat produk pangan seperti yoghurt dan tempe. Tetapi, banyak juga mikroba yang dapat menyebabkan infeksi dan intoksikasi pada manusia dan hewan. Pangan menjadi beracun karena tercemar oleh mikroba tertentu dan mikroba tersebut menghasilkan racun yang dapat membahayakan konsumen. Jenis mikroba penyebab keracunan pangan adalah virus, parasit, kapang dan bakteri (POM, 2009).

Bahaya kimia terjadi karena penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) yang melebihi batas yang diijinkan, dan penyalahgunaan pemakaian bahan kimia berbahaya untuk pangan, karena masuknya cemaran bahan kimia ke dalam makanan dan karena racun yang sudah terkandung di dalam bahan makanan.

Bahan Tambahan Pangan (BTP) adalah bahan atau campuran bahan yang secara alami bukan merupakan bagian dari bahan baku pangan, tetapi ditambahkan ke dalam pangan untuk mengawetkan pangan, membentuk pangan menjadi lebih baik, renyah dan lebih enak di mulut, memberikan warna dan aroma yang lebih menarik sehingga menambah selera, meningkatkan kualitas pangan dan menghemat biaya. Biasanya gangguan kesehatan yang disebabkan oleh bahaya kimia baru akan muncul dalam waktu yang agak lama. Contoh penyalahgunaan bahan aditif non pangan adalah penggunaan pewarna tekstil untuk pangan. Bahaya kimia juga dapat berasal dari cemaran kimia yang masuk ke dalam pangan. Cemaran kimia tersebut misalnya cairan pembersih, pestisida, cat, minyak, komponen kimia dari peralatan atau kemasan yang lepas dan masuk ke dalam pangan. Logam berat masuk melalui air yang tercemar, kertas koran yang digunakan untuk mengemas pangan dan asap kendaraan bermotor. Beberapa bahan pangan secara alami mengandung toksin atau bahan beracun (POM, 2009).

1.3 Penggunaan Antibiotik pada Ikan

Penggunaan antibiotik dan hormon pada ikan telah diatur dalam Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia tahun 2014 tentang Klasifikasi Obat Ikan.

Antibiotika digunakan untuk hewan sebagaimana digunakan pada manusia yaitu untuk mencegah dan mengobati infeksi. Manfaat pengobatan dengan antibiotika antara lain membasmi agen penyakit (Butaye *et.al.*, 2003), menyelamatkan hewan dari kematian, mengembalikan kondisi hewan untuk

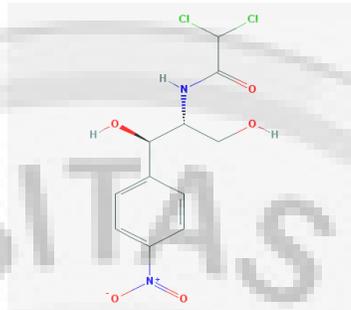
berproduksi kembali dalam waktu yang relatif singkat, mengurangi atau menghilangkan penderitaan hewan dan mencegah penyebaran mikroorganisme ke alam sekitarnya yang dapat mengancam kesehatan hewan dan manusia (Adam, 2002).

1.3.1 Residu Antibiotik

Antibiotika adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh berbagai jasad renik bakteri, jamur dan aktinomises, yang dapat berkhasiat menghentikan pertumbuhan atau membunuh jasad renik lainnya. Antibiotika banyak disalahgunakan penggunaannya untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada hewan ternak (Subronto dan Tjahajati, 2001).

Antibiotik yang diberikan pada hewan akan masuk ke dalam sirkulasi darah dan berinteraksi dengan reseptor di dalam tubuh. Interaksi tersebut dibedakan menjadi dua macam yaitu aksi antibiotik terhadap tubuh yang diwujudkan dalam bentuk efek obat, dan reaksi tubuh terhadap antibiotik atau cara tubuh menangani senyawa eksogen. Secara simultan antibiotik didistribusikan ke dalam tubuh setelah diabsorpsi. Umumnya antibiotik bersifat mudah larut dalam lemak dan dapat dengan mudah melewati membran-membran sel atau jaringan sehingga dengan cepat didistribusikan ke seluruh jaringan tubuh, termasuk ke hati dan ginjal (Murtidjo 2007).

1.3.2 Kloramfenikol



Gambar I.2. Kloramfenikol

Kloramfenikol mempunyai rumus molekul $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ dengan bobot molekul 320,97. Kloramfenikol merupakan serbuk kristal putih sampai putih keabuan atau putih kekuningan, tidak berbau, sangat tidak larut dalam air, sangat larut dalam alkohol dan propilen glikol (POM, 1995).

Kloramfenikol merupakan antibiotik golongan amfenikol yang bersifat bakteriosidal dengan memiliki aktifitas spektrum luas aktif terhadap bakteri yang patogen dengan jalan menghambat sintesis protein dengan cara mengikat sub unit 30 S dari pada ribosom sel bakteri dan menghambat aktifitas enzim peptidil transferase. Kloramfenikol dahulu digunakan dalam pengobatan untuk hewan ternak dan manusia tetapi karena adanya laporan bahwa kloramfenikol menimbulkan penyakit anemia aplastik bagi manusia sehingga sejak tahun 1994 di Amerika dan Eropa penggunaan kloramfenikol tidak diijinkan untuk pengobatan hewan ternak (Martaleni, 2007).

Munculnya sifat resistensi mikroba terhadap antibiotik dan bahayanya residu antibiotika yang berdampak negatif bagi masyarakat menyebabkan beberapa jenis antibiotika *broad spectrum* dilarang beredar dan dipergunakan untuk obat

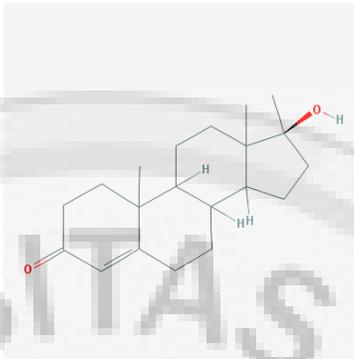
ikan. (keputusan menteri kelautan dan perikanan KepMen No. 26/MENKP/2002 tentang pelarangan penggunaan antibiotik).

1.4 Residu Hormon

Residu hormon itu merupakan senyawa asal dan atau metabolitnya yang terdapat dalam jaringan produk hewani dan termasuk residu hasil uraian lainnya. Keberadaan residu hormon dapat ditemukan saat hewan disembelih pada bagian otot, lemak, hati, ginjal, dan organ dalam lainnya. Batas maksimum residu hormon dalam produk pangan asal hewan telah diatur dalam CODEX *Alimentarius Commission*. Hal ini dikarenakan, adanya dugaan dampak terhadap gangguan kesehatan konsumen dari keberadaan residu tersebut dalam pangan yang apabila dikonsumsi dalam waktu lama (Famia *et.al.*, 2014).

Organisme monoseks dapat dihasilkan melalui metode manipulasi kelamin (*sex reversal*), dengan pendekatan hormonal sebelum diferensiasi kelamin. Hormon steroid yang diberikan, menyebabkan zigot dengan genotipe XX akan berkembang menjadi karakter jantan secara fenotipe atau sebaliknya zigot dengan genotipe XY akan berkembang menjadi karakter betina secara fenotipe (Bustaman *et.al.*, 2009).

1.4.1 Hormon Metiltestosteron



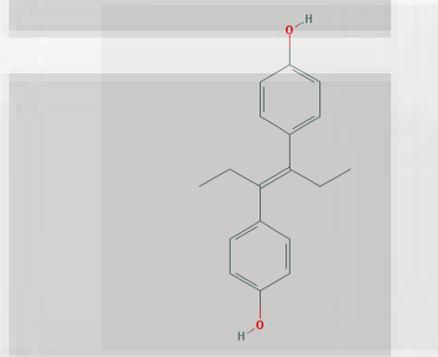
Gambar 1.3 Hormon Metiltestosteron

Secara fisiologis, jenis kelamin ikan dapat diubah dengan hormon steroid. Hormon tersebut pertama kali akan merangsang fenomena reproduksi yaitu merangsang diferensiasi gonad, gametogenesis, ovulasi, spermatogenesis, pemijahan dan tingkah laku kawin. Proses ini hanya akan berpengaruh terhadap fenotip jenis kelamin dan tidak pada genotipnya, dimana jenis gonosomnya tetap. Perubahan jenis kelamin secara buatan dimungkinkan karena pada awal pertumbuhan gonad belum terdiferensiasi menjadi testes atau ovari dengan menggunakan hormon steroid sintetis (Arfah dan Carman, 2005).

Metiltestosteron adalah hormon sintetis dengan rumus molekul $C_{20}H_{30}O_2$ dan bobot molekul 303,17; yang dapat menyebabkan kerusakan hati hewan yang diberi perlakuan, serta hampir identik dengan hormon yang terdapat pada manusia. Akibatnya jika diberikan pada udang dan ikan konsumsi dengan manajemen salah, dapat mengganggu kesehatan manusia jika mengkonsumsinya. Hasil bioassai pada ayam, menunjukkan bahwa hormon sintetis memberikan efek samping toksik pada hati, limpa, dan *bursa fabricius* (Riani et.al., 2010).

Untuk tujuan komersial, *sex reversal* pada nila (*Oreochromis niloticus*) umumnya ditujukan untuk memproduksi ikan jantan secara masal. Hal ini disebabkan pertumbuhan nila jantan lebih cepat dibandingkan nila betina. Dalam memanipulasi kelamin jantan pada nila, hormon steroid yang paling efektif menggunakan hormon steroid 17 α -metiltestosteron yang diberikan secara oral melalui pakan. Penerapan *sex reversal* pada nila dapat dilakukan dengan metode perendaman embrio, perendaman larva dan perendaman pakan (Bustaman *et.al.*, 2009).

1.4.2 Hormon Dietilstilbestrol



Gambar 1.4 Hormon Dietilstilbestrol

Dietilstilbestrol (DES) adalah suatu hormon estrogen sintetis dengan rumus molekul $C_{18}H_{20}O_2$ dan bobot molekul 266,94. Pada tahun 1950-an hingga 1960-an DES diberikan kepada wanita yang dianggap beresiko keguguran. Wanita yang ibunya pernah menggunakan DES ketika mengandungnya memiliki resiko tinggi untuk mengalami resiko kelainan dalam organ tubuhnya (Ana, 2006).

Dietilstilbestrol digunakan sebagai zat pemacu pertumbuhan dan yang ditanamkan subkutan pada bagian hewan yang biasanya tidak dimakan, misalnya telinga. Tingkat residunya dalam daging cukup rendah sehingga praktis tidak akan

menghasilkan efek toksik umum kecuali karsinogenisitas. Suatu karsinogen dapat efektif pada dosis yang sangat rendah. DES tidak lagi digunakan sebagai zat pemacu pertumbuhan karena adanya penemuan bahwa tumor organ genital dapat muncul pada keturunan seorang ibu yang selama kehamilannya mendapat DES dalam dosis besar untuk tujuan medis (Ratnani, 2009).

1.4.3 Mekanisme Kerja Hormon

Mekanisme kerja hormon sintesis pada hewan hormon mula-mula berikatan dengan reseptor hormon yang terdapat di permukaan sel atau di dalam sel. Ikatan hormon dan reseptor memulai timbulnya rangkaian reaksi kimia di dalam sel. Setiap reseptor sangat spesifik untuk satu macam hormon. Keadaan inilah yang menentukan macam hormon yang akan bekerja pada suatu jaringan tertentu. Jaringan target yang berpengaruh adalah jaringan yang mempunyai reseptor spesifik (Guyton, 1994).

1.5 *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran berdasarkan pada perbedaan migrasi masing-masing analit senyawa pada fase diam dibawah pengaruh fase gerak. Dasar pemisahan kromatografi adalah terjadinya perubahan dari sistem kesetimbangan distribusi statis molekul senyawa ke sistem kesetimbangan distribusi dinamik diantara fase diam dan fase gerak yang berkesinambungan. Karena molekul analit pada kondisi variabel kromatografi tertentu mempunyai tetapan kesetimbangan distribusi dinamik yang khas, maka akan terjadi pola pemisahan yang tetap (Yuwono, 2009)

Kromatografi cair merupakan dasar teknik pemisahan di bidang sains dan terkait dengan kimia. Kromatografi cair dapat dengan aman memisahkan senyawa organik dengan rentang yang sangat luas yaitu mulai dari metabolit obat dengan molekul kecil sampai peptida dan protein (Alfian, 2012).

Detektor umum dari kromatografi cair termasuk indeks refraksi, elektrokimia, fluoresensi, dan *ultraviolet-visible* (UV-Vis). Beberapa dari detektor tersebut memberikan data dua dimensi yaitu data yang menunjukkan kekuatan sinyal sebagai fungsi atas waktu. Detektor fluoresensi dan UV-Vis menghasilkan data tiga dimensi yaitu tidak hanya kekuatan sinyal namun data spektrum dari masing-masing poin waktu. Spektrometer massa juga menghasilkan data tiga dimensi. Selain kekuatan sinyal juga menghasilkan data massa spektral yang dapat memberikan informasi berharga tentang struktur, berat molekul, identifikasi, jumlah, dan kemurnian sampel. Data spektral massa menambahkan spesifisitas yang meningkatkan kepercayaan dalam hasil dari analisis baik kualitatif maupun kuantitatif. Untuk sebagian besar senyawa yang dianalisis dengan spektrometer massa jauh lebih sensitif dan lebih spesifik daripada semua detektor kromatografi cair lainnya. Hal ini dapat menganalisis senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor yang cocok. Hal ini juga dapat mengidentifikasi komponen dalam kromatografi dengan puncak yang belum terselesaikan, mengurangi kebutuhan untuk kromatografi yang sempurna (Alfian, 2012).

Data spektral massa melengkapi data dari detektor kromatografi cair lainnya. Beberapa spektrometer massa memiliki kemampuan untuk melakukan beberapa langkah spektrometri massa pada sampel tunggal. Hal tersebut bisa

menghasilkan spektrum massa, memilih secara selektif ion tertentu dari spektrum, fragmen ion, dan menghasilkan spektrum massa lainnya serta mengulang seluruh siklus beberapa kali. Spektrometer massa seperti secara harfiah dapat mendekonstruksi molekul kompleks sepotong demi sepotong sampai struktur dapat ditentukan (Alfian, 2012).

1.5.1 Sumber Ion *Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS)

Selama sepuluh tahun terakhir banyak kemajuan pada LC-MS/MS dalam pengembangan sumber ion molekul analit dari fase geraknya. Sebelum LC-MS/MS menggunakan sistem antarmuka yang kurang baik dalam memisahkan molekul fase gerak dari molekul analit. Molekul analit yang terionisasi dalam spektrometer massa berada pada kondisi vakum, peristiwa semacam ini sering terjadi pada ionisasi elektron konvensional. Teknik ini berhasil hanya untuk jumlah senyawa yang sangat terbatas (Vogeser, *et.al.*, 2008).

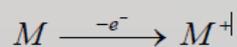
Pengenalan teknik ionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure ionization/API*) sangat memperluas jumlah senyawa yang dapat dianalisis dengan LC-MS/MS. Pada teknik ionisasi tekanan atmosfer, molekul analit terionisasi terlebih dahulu pada tekanan atmosfer. Ion analit tersebut kemudian secara mekanis dan elektrostatis terpisah dari inti molekul. Teknik ionisasi tekanan atmosfer umumnya adalah (Vogeser, *et.al.*, 2008):

1. Ionisasi elektropray (*electrospray ionization/ESI*)
2. Ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI)
3. *Photoionisasi* tekanan atmosfer (APPI)

Dalam setiap pengukuran sifat analit dan kondisi pemisahan memiliki pengaruh kuat untuk memberikan hasil terbaik dalam teknik ionisasi pada elektrospray, APCI maupun APPI. Teknik yang paling efektif tidak selalu mudah untuk diprediksi (Agilent Technologies, 2001).

1.5.2 Analisis Massa

Spektroskopi massa adalah suatu teknik analisis yang mendasarkan pemisahan berkas ion-ion yang sesuai dengan perbandingan massa dengan muatan dan pengukuran intensitas dari berkas ion-ion tersebut. Dalam spektroskopi massa, molekul-molekul senyawa organik ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion positif yang bertenaga tinggi (ion-ion molekuler atau ion-ion induk), yang dapat dipecah-pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil (ion-ion pecahan). Lepasnya elektron dari molekul akan menghasilkan radikal kation, yang dapat dituliskan sebagai berikut (Sitorus, 2009):



Gambar I.5. Pelepasan Elektron dari Molekul

Ion-ion molekuler, ion-ion pecahan dan ion-ion radikal pecahan selanjutnya dipisahkan oleh pembelokan medan magnet yang dapat berubah sesuai dengan massa dan muatannya, dan akan menimbulkan arus pada kolektor yang sebanding dengan limpahan relatif mereka (Sitorus, 2009).

Spektrum massa akan menghasilkan puncak-puncak yang tercatat dalam rekorder, yang dipaparkan sebagai grafik batangan. Fragmen-fragmen disusun sedemikian sehingga puncak ditata menurut kenaikan muatan (m/z) dari kiri ke

kanan dalam spektrum. Intensitas puncak sebanding dengan kelimpahan relatif fragmen-fragmen yang bergantung pada stabilitas relatif mereka. Puncak yang paling tinggi dinamakan *base peak* (puncak dasar) diberi nilai intensitas sebesar 100%; *peak-peak* yang lebih kecil dilaporkan misalnya 20%, 30%, menurut nilainya relatif terhadap *peak dasar* (Sitorus, 2009).

1.6 Validasi Metode

Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. (Gandjar dan Rohman, 2007).

1.6.1 Ketepatan (akurasi)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konversi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. (Gandjar dan Rohman, 2007).

1.6.2 Perolehan Kembali

Akurasi ditentukan dengan 4 cara sebagai persen perolehan kembali. (1) Analisis kadar analit dengan metode yang divalidasi terhadap sampel yang telah diketahui kadarnya. Sampel yang digunakan adalah sampel acuan baku yang dikeluarkan badan resmi. (2) Analisis kadar analit yang ditambahkan kedalam matriks sampel (plasebo) yang dianalisis (*spiked method*). (3) Jika matriks dan eksipien tidak tersedia, maka akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali kadar analit mengandung analit (*standar addition method*). (4)

Membandingkan hasil analisis analit dengan metode yang divalidasi terhadap hasil dengan metode baku (Gandjar dan Rohman, 2007).

1.6.3 Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Sesuai dengan ICH (*International Conference on Harmonization*), presisi harus dilakukan pada tingkatan yang berbeda yaitu (Gandjar dan Rohman, 2007):

- a. Keterulangan yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya
- b. Presisi antara yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- c. Ketertiruan merujuk pada hasil-hasil dari laboratorium yang alin.

Dokumentasi presisi seharusnya mencakup: simpangan baku, simpangan baku relatif, atau koefisien variasi, dan kisaran kepercayaan. (Gandjar dan Rohman, 2007).

1.6.4 Batas Deteksi (*Limit of Detection, LOD*)

Batas deteksi (LOD) adalah batas kadar terkecil yang masih dapat dideteksi oleh alat dan menghasilkan respon yang bermakna. Metode penentuan batas deteksi dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu cara visualisasi, kalkulasi perbandingan dari sinyal ke *noise*, kalkulasi standar deviasi dari sampel

blank, kalkulasi dari kalibrasi pada konsentrasi terendah (Shrivastava dan Gupta, 2011).

1.6.5 Linieritas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (Gandjar dan Rohman, 2007).