II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Budidaya Ayam Pedaging (Broiler)

Ayam pedaging (broiler) adalah ayam ras yang mampu tumbuh cepat sehingga dapat menghasilkan daging dalam waktu relatif singkat (5-7 minggu). Daging ayam mempunyai peranan yang penting sebagai sumber protein hewani asal ternak.

Gambar 1. Budidaya ayam pedaging (broiler)
(Sumber: www.produknaturalnusantara.com)

Pakan adalah hal yang paling utama dalam beternak ayam pedaging. Pakan yang diberikan harus mengandung nutrisi yang dibutuhkan ayam, yaitu karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan mineral, sehingga pertambahan berat badan perhari tinggi. Pemberian pakan dengan sistem *ad libitum* (selalu tersedia atau tidak dibatasi).

Apabila menggunakan pakan dari pabrik, maka jenis pakan disesuaikan dengan tingkat pertumbuhan ayam, yang dibedakan menjadi dua tahap. Tahap pertama disebut tahap pembesaran (umur 1 – 20 hari), yang harus mengandung kadar protein minimal 23%. Tahap kedua disebut penggemukan (umur diatas 20 hari), yang memakai pakan berkadar protein 20%.

1. Penyakit pada Ayam Pedaging

Penyakit yang sering menyerang ayam pedaging, yaitu:

a. Penyakit ngorok *(Chronic Respiratory Disease/CRD)*

CRD juga dikenal dengan istilah *mycoplasma gallisepticum* (MG) atau PPLO, merupakan salah satu penyakit yang sering ditemui pada peternakan ayam pedaging. Penyakit ini disebabkan oleh virus *Mycoplasma gallisepticum* yang menyerang saluran pernapasan, terutama pada ayam broiler muda (antara umur 3-5 minggu). Gejalanya ayam terlihat diam, lesu, dan kehilangan nafsu makan atau tidak mau makan secara tiba-tiba. Selain itu, tinja berbentuk cair dan berwarna putih, bulu pucat dan kusam, serta pada bagian sekitar anus tampak lengket dan terkena iritasi (Rasyaf, 2008).

Walaupun tidak mengakibatkan kematian, namun serangan penyakit ini bisa menyebabkan tingkat morbiditas (keadaan tidak sehat) yang cukup tinggi. Penyakit CRD bisa ditularkan dari ayam ke ayam, atau dari induk yang sudah terkena CRD dan terbawa ke dalam telur tetasnya. Selain itu, penyebaran penyakit ini juga bisa melalui tamu

yang berkunjung ke peternakan atau penggunaan peralatan yang belum disterilkan.

Upaya pencegahan paling dini terhadap penyakit ini adalah penggunaan bibit yang bebas CRD dan menjaga kebersihan kandang. Upaya pengobatan pada ayam yang sudah terserang CRD adalah dengan memberikan antibiotik seperti tetrasiklin, *bacitracin* dan *tylocin* yang diberikan ke dalam minuman, pakan, atau diberikan lewat injeksi (Rasyaf, 2008).

b. Tetelo *(Newcastle Disease/ND)*

Penyakit ini disebabkan oleh virus *Paramyxo* yang bersifat menggumpalkan sel darah. Gejala penyakit ini sangat khas, yakni ayam mengalami gangguan saraf berupa gejala tortikolis, dimana kepala ayam akan bergerak ke kanan-kiri atau atas-bawah dalam frekuensi yang cukup tinggi. Gejala lainnya adalah ayam terlihat mengantuk, sayap terkulai, kaki lumpuh, terjadi gangguan pencernaan seperti diare, dan tidak mau makan.

Tetelo bisa menyebabkan kematian yang sangat tinggi dan dalam waktu yang singkat. Penyakit ini disebabkan oleh virus dari famili *Paramyxoviridae* yang hingga kini belum ditemukan obatnya. Upaya yang bisa dilakukan hanyalah pencegahan melalui pemberian vaksin ND yang diberikan ketika ayam berumur 1-4 hari (minggu pertama) dan antibiotik selama 3-5 hari untuk mencegah adanya infeksi sekunder (Rasyaf, 2008).

c. *Coccidiosis* atau berak darah

Penyakit ini disebabkan oleh protozoa genus *Eimeria* yang menyerang alat pencernaan ayam, seperti usus halus dan usus buntu. *Coccidiosis* menyerang ayam muda yang berumur 4-14 minggu. Gejala khasnya adalah munculnya bercak-bercak kotoran ayam berbentuk lembek atau cairan berrwarna merah (karena bercampur darah) pada lantai kandang.

Sebagai upaya pencegahan awal, untuk memutus siklus penyakit ini, peternak sengaja memberikan masa kosong kandang selama 2 minggu sehabis masa panen. Bisa juga dengan pemberian vaksin lewat tetes mata pada ayam umur 1-4 hari atau lewat air minum pada ayam umur 7-10 hari. Untuk pengobatan, bisa dengan memberikan obat-obatan, seperti *sulfaquinoxaline, sulfamethazine,* amprolium, dan agribon yang dicampurkan ke dalam air minumnya, dicampur dalam ransum, atau disuntikkan (Fadilah, 2013).

d. *Infectious Coryza* atau Snot (pilek ayam)

kasus serangan pilek ayam banyak ditemukan pada peternakan ayam pedaging maupun ayam petelur. Penyebabnya adalah bakteri *Haemophyllus paragallinarum*. Penyakit ini menyerang ayam pada segala umur dan biasanya kemunculannya bersamaan dengan serangan CRD. Gejala serangan yaitu ayam terlihat seperti kedinginan, mengalami bersin-bersin disertai keluarnya lendir,

sayap terkulai, mata tampak bengkak, sayu, dan berair, dan pada lubang di atas paruhnya keluar cairan.

Untuk pencegahan terhadap serangan penyakit ini bisa diberikan antibiotik ke dalam air minumnya. Akan lebih baik bila ayam diberi vaksinasi *coryza*, sedangkan pada ayam yang sudah terkena bisa diberikan obat-obatan seperti *streptomycin, sulfadimethoxine, spectinomycin*, atau *erythromycin* (Rasyaf, 2008).

e. Gumboro *(Infectious Bursal Disease/IBD)*

Kasus pertama penyakit gumboro ditemukan pada tahun 1962 di Gumboro, Amerika Serikat. Gejala yang tampak dari serangan ini adalah ayam secara mendadak kehilangan nafsu makannya, bulunya tampak lusuh dan kotor, serta tinja cair berwarna putih. Penyakit ini disebabkan oleh virus genus *Avibirnavirus* yang menyerang sistem antibodi ayam sehingga daya tahan tubuhnya terhadap penyakit menjadi turun dan mudah terserang berbagai penyakit lainnya, seperti ND. Pengobatan dilakukan dengan pemberian air gula (5-8%), parasetamol, multivitamin untuk meningkatkan kondisi tubuh, pemberian pemanas untuk anak ayam, antibiotik (3-5 hari) untuk mencegah infeksi sekunder (Rasyaf, 2008).

f. *Fowl Cholera* (penyakit berak hijau)

Penyakit ini disebabkan oleh *Pasteurella multocida*. Penyakit ini menyerang ayam secara akut dengan tingkat serangan dan kematian sangat tinggi. Pada umur 12-18 minggu, ayam sangat rentan

terserang penyakit ini. Gejala yang terjadi anoreksia, depresi, hidung dan mulut berisi lendir, diare dengan cairan putih, atau diare berwarna hijau (berak hijau). Antibiotik yang umum digunakan adalah sulfametoksin, *sulfaquinoxaline*, sulfametazin, tetrasiklin, eritromisin, streptomisin, dan penisilin (Fadilah, 2013).

g. Aspergillosis (*Brooder Pneumonia*, *Mycotic Pneumonia*, atau *Pneumomycosis)*

Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Aspergillus fumigatus*. Gejalanya berupa diare, anoreksia, dan aym menjadi kurus. Pencegahan harus dilakukan mulai dari pembibitan. Pengobatan dilakukan dengan memberikan antibiotika seperti furazolidon, tetrasiklin, neomisin, dan obat-obatan sulfa (Fadilah, 2013).

h. Infeksi *Paratyphoid*

Penyakit ini disebabkan oleh *Salmonella* sp. Infeksi *paratyphoid* lebih sering menyerang ayam muda yang umurnya kurang dari tujuh minggu. Ayam yang terserang penyakit ini akan mengalami diare yang diikuti dehidrasi. Kotorannya berbentuk pasta dan badan menggigil. Antibiotika yang sering digunakan adalah furazolidon, *sulfaquinoxaline*, sulfametoksin, dan tetrasiklin (Fadilah, 2013).

B. Antibiotika

Antibiotika adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh berbagai jasad renik, hasil sintesis, semi sintetis yang mempunyai struktur yang sama dan zat ini dapat merintangi atau memusnahkan jasad lainnya. Antibiotika merupakan

obat yang sangat penting dan dipakai untuk memberantas berbagai penyakit infeksi, misalnya radang paru-paru, *typhus*, luka-luka yang berat dan sebagainya. Penggunaan antibiotika harus dibawah pengawasan seorang dokter, karena dapat menimbulkan kerja ikutan yang tidak dikehendaki dan kerugian yang cukup besar bila pemakaiannya tidak dikontrol dengan betul (Wijajanti, 2011).

1. Penggolongan Antibiotik

a. Golongan Antibiotik Berdasarkan Mekanisme Kerja

1) Inhibitor sintesis dinding sel bakteri, mencakup golongan penisilin, polipeptida dan sefalosporin.
2) Inhibitor sintesis protein, mencakup golongan makrolida, aminoglikosida, dan tetrasiklin.
3) Inhibitor fungsi membran sel, misalnya *ionomycin*, *valinomycin*.
4) Inhibitor fungsi sel lainnya, seperti golongan sulfonamida.
5) Antimetabolit, misalnya azaserine.

b. Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Daya Kerjanya

1) Bakterisida

   Antibiotika yang bakterisida secara aktif membasmi kuman. Termasuk dalam golongan ini adalah penisilin, sefalosporin, aminoglikosida (dosis besar), kotrimoksazol, polipeptida, rifampisin, isoniazid.

2) Bakteriostatik

Antibiotika bakteriostatik bekerja dengan mencegah atau menghambat pertumbuhan kuman, tidak membunuhnya, sehingga pembasmian kuman sangat tergantung pada daya tahan tubuh. Termasuk dalam golongan ini adalah sulfonamida, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim, linkomisin, makrolida, klindamisin, asam paraaminosalisilat.

Manfaat dari pembagian ini dalam pemilihan antibiotika mungkin hanya terbatas, yakni pada kasus pembawa kuman (*carrier*) pada pasien-pasien dengan kondisi yang sangat lemah (*debilitated*) atau pada kasus-kasus dengan depresi imunologik tidak boleh memakai antibiotika bakteriostatik, tetapi harus bakterisid.

c. Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Spektrum Kerjanya

1) Spektrum Luas (aktivitas luas)

Antibiotik yang bersifat aktif bekerja terhadap banyak jenis mikroba yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Contoh antibiotik dalam kelompok ini adalah sulfonamid, ampisilin, sefalosforin, kloramfenikol, tetrasiklin, dan rifampisin.

2) Spektrum Sempit (aktivitas sempit)

Antibiotik yang bersifat aktif bekerja hanya terhadap beberapa jenis mikroba saja, bakteri gram positif atau gram negatif saja. Contohnya eritromisin, klindamisin, kanamisin, hanya bekerja

terhadap mikroba gram-positif, sedangkan streptomisin, gentamisin, hanya bekerja terhadap kuman gram-negatif (Tan dan Rahardja, 2008).

2. Penggunaan Antibiotika dalam Peternakan

Seperti yang tercantum dalam Peraturan Pemerintah Nomor 78 Tahun 1992 tentang Obat Hewan, sediaan obat hewan menurut kegunaannya atau asalnya dibagi menjadi empat golongan, yaitu golongan farmasetik, biologik, premik, dan golongan obat lain. Obat yang termasuk golongan farmasetik meliputi vitamin, hormon, antibiotika dan kemoterapetika lainnya seperti anthelmentika, antiprotozoa, antihistamin, antipiretika, dan anaestetika. Sedangkan yang dimaksud dengan golongan biologik adalah sediaan yang dihasilkan melalui proses biologi, umumnya mempunyai fungsi bukan untuk mengobati penyakit melainkan untuk pencegahan, seperti vaksin. Sediaan premik adalah obat yang dapat dicampurkan ke dalam pakan, yang dibedakan sebagai imbuhan pakan *(feed additive)* dan pelengkap pakan *(feed supplement)* (Murdiati, 1997).

Imbuhan pakan merupakan suatu bahan yang ditambahkan ke dalam pakan dalam jumlah kecil. Secara alami imbuhan pakan bukan merupakan bahan yang terdapat dalam pakan, tetapi apabila ditambahkan pada pakan akan memperbaiki kualitas pakan, dapat meningkatkan efisiensi dari pakan, sehingga dapat meningkatkan produksi ternak. Sedangkan yang dimaksud dengan pelengkap pakan adalah suatu bahan yang secara alami sudah terkandung dalam pakan, tetapi jumlahnya

kurang mencukupi sehingga perlu ditambah dengan cara mencampurkan pada pakan (Murdiati, 1997).

Obat hewan berdasarkan tingkat bahaya dalam pemakaiannya dapat digolongkan menjadi tiga golongan, seperti yang dinyatakan dalam Surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor 806 Tahun 1994, yaitu golongan obat keras, obat bebas terbatas, dan obat bebas. Obat keras adalah obat hewan yang bila pemakaiannya tidak sesuai dengan ketentuan dapat menimbulkan bahaya bagi hewan dan atau manusia yang mengkonsumsi hasil hewan tersebut. Obat bebas terbatas adalah obat keras yang diperlakukan sebagai obat bebas untuk jenis hewan tertentu, dengan jumlah, dosis, bentuk sediaan, dan cara pemakaian yang tertentu. Obat bebas yaitu obat hewan yang dapat dipakai secara bebas oleh setiap orang pada setiap jenis hewan. Antibiotika dan kemoterapetika yang digunakan untuk mengobati suatu penyakit, pada umumnya digolongkan sebagai obat keras.

Di bidang peternakan, selain untuk tujuan terapetik, antibiotika juga dipakai sebagai imbuhan pakan yang secara umum bermanfaat karena secara tidak langsung berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme perusak zat-zat gizi dalam pakan dan merangsang pertumbuhan mikroorganisme pembentukan asam (Bahri, 2008). Inbuhan pakan yang diizinkan beredar di Indonesia dibedakan atas kelompok antibiotika dan kelompok non-antibiotika. Kelompok antibiotika berdasarkan Surat Keputusan Dirjen Peternakan Tahun 1991, telah

terdaftar sebanyak 19 jenis, seperti yang terlihat pada tabel 1 (Infovet, 1994).

Tabel 1. Daftar imbuhan pakan yang diizinkan beredar di Indonesia

Golongan non-antibiotika	Golongan antibiotika
Aklomide	Zink basitrasin
Amprolium	Virginiamisin
Butinorat	Flavomisin
Klopidol	Higromisin
Dequinate	Monensin
Etopabate	Salinomisin
Levamisole	Spiramisin
Piperasin basa	Kitasamisin
Piperasin istrat	Tiamulin hidrogen fumarat
Tetramisol	Tilosin
Robenidin	Lasalosid
Roksarson	Avilamisin
Sulfaklopirasin	Avoparsin
Sulfadimetoksin	Envamisin
Sulfanitran	Kolistin sulfat
Sulfaquinoksaline	Linkomisin hidroklorida
Buquinolate	Maduramisin
Nitrofurason	Narasin
Furasolidon	Nastatin
Phenotiasin	
Halquinol	
Pirantel tartrat	
Olaquindoks	
Aluminium silikat	
Nitrovina	

Sumber: Infovet, 1994

Keinginan untuk memperoleh keuntungan yang besar telah menyebabkan terjadinya persaingan yang tidak sehat dalam memasarkan antibiotika sebagai imbuhan pakan, seperti golongan tetrasiklin yang tidak termasuk dalam daftar imbuhan pakan yang diizinkan, tetapi karena harganya relatif murah dibandingkan antibiotika yang memang diperolehkan untuk

imbuhan, maka golongan tetrasiklin banyak dipergunakan sebagai imbuhan pakan (Balitvet, 1991; Bahri, 2008).

3. Residu Antibiotika dalam Produk Peternakan

Residu obat adalah sisa dari obat atau metabolitnya dalam jaringan atau organ hewan/ternak setelah pemakaian "obat hewan". Menurut Bahri dkk. (2005) pemberian antibiotika sebagai pakan ternak yang diberikan dalam waktu yang cukup lama dengan tidak memperhatikan aturan pemberiannya akan terakumulasi di dalam jaringan tubuh ternak sehingga menyebabkan terdapatnya residu pada jaringan tubuh ternak. Residu antibiotika yang terakumulasi memiliki konsentrasi yang berbeda-beda antara jaringan dari tubuh ternak satu dengan yang lainnya (Bahri dkk., 2005).

Akibat penggunaan antibiotika yang luas dalam pakan ternak, banyak penelitian mengenai keberadaan antibiotika di dalam jaringan tubuh ternak. Oramahi dkk. (2004) melakukan pengujian terhadap 65 sampel hati ayam secara mikrobiologi dan diperoleh residu antibiotika golongan penisilin sebesar 29,23%, golongan makrolida sebesar 36,92%, golongan aminoglikosida sebesar 1,54 % dan golongan tetrasiklin 26,15%. Dewi dkk. (2002) dan Handayani dkk. (2003) telah menemukan residu antibiotika berupa golongan tetrasiklin, penisilin, aminoglikosida, dan makrolida pada sampel produk asal hewan baik daging segar maupun daging olahan yang diambil dari pasar tradisional dan rumah potong

hewan di wilayah Kabupaten Badung (Bali), Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur.

Hasil penelitian Karlina (2011) mendapatkan residu kloramfenikol pada telur yang beredar di Sumatera Utara sebesar 0,0752 - 0,1937 µg/g, dimana kadar yang diperoleh melebihi persyaratan yang ditetapkan oleh pemerintah. Christina (2011) menemukan kadar tetrasiklin yang melebihi batas kadar yang ditetapkan oleh pemerintah dalam daging ayam yang diambil dari pasar swalayan di kota Medan sebesar 4,9141 µg/g dan 8,5556 µg/g.

Di Indonesia, kesadaran akan bahaya residu antibiotika dalam produk peternakan masih kurang mendapat perhatian, karena pengaruhnya tidak terlihat secara langsung. Akan tetapi akan membahayakan kesehatan manusia, apabila produk peternakan seperti susu, daging, dan telur yang mengandung residu dikonsumsi secara terus-menerus setiap hari. Salah satunya misalnya terjadi reaksi alergi dari antibiotik golongan penisilin pada konsumen yang sensitif. Efek lain yang mungkin timbul yaitu terjadinya keracunan, resistensi mikroba terhadap antibiotik tertentu, dan gangguan fisiologis pada manusia (Botsoglou *and* Fletouris, 2001).

Seharusnya, pada pemakaian antibiotika dan obat hewan lainnya dalam bidang peternakan perlu diperhatikan waktu henti atau *withdrawl time* dari antibiotika yang bersangkutan. Waktu henti adalah kurun waktu dari saat pemberian obat yang terakhir hingga ternak boleh dipotong atau produknya seperti susu dan telur boleh dikonsumsi (Bahri, 2008).

Tabel 2. Waktu henti beberapa obat hewan

Jenis antibiotika	Jenis hewan	Cara pemakaian	Waktu henti (hari)
Ampisilin	Ayam	Injeksi	5
	Sapi	Injeksi	6
Amprolium	Sapi	Oral	1
Dihidrostreptomisin	Babi	Injeksi	30
	Sapi	Injeksi	30
Eritromisin	Babi	Injeksi	7
	Sapi	Injeksi	14
Furazolidon	Ayam	Oral	5
	Babi	Oral	5
Karbadoks	Babi	Oral	70
Klortetrasiklin	Ayam	Injeksi	15
Monensin	Ayam	Oral	3
Nitrofurazon	Ayam	Oral	5
	Babi	Oral	5
Penisillin G	Ayam	Injeksi	5
	Babi	Injeksi	5
Oksitetrasiklin	Ayam	Injeksi	15
Streptomisin	Babi	Injeksi	30
	Sapi	Injeksi	30
Preparat sulfonamida	Sapi	Oral	7-15
Tetrasiklin	Sapi	Oral	5
Thiobendazol	Sapi	Oral	3
Tilosina	Babi	Oral	2
Streptomisin	Ayam	Oral	4
	Sapi	Oral	2

Sumber: Ditjennak, 1993

Waktu henti satu antibiotika dan lainnya tidaklah sama, sangat dipengaruhi oleh proses absorbsi, distribusi, dan eliminasi dari obat yang bersangkutan, juga tergantung dari jenis ternak dan cara pemakaiannya, seperti terlihat pada Tabel 2. Setelah waktu henti terlampaui, diharapkan tidak ditemukan lagi residu obat atau residu berada di bawah batas maksimum residu (BMR), sehingga produk ternak yang bersangkutan dapat dikatakan aman untuk dikonsumsi.

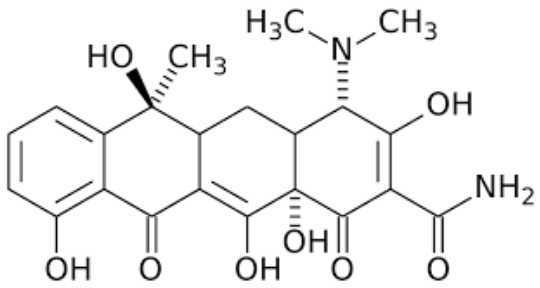
C. Tetrasiklin

Tetrasiklin merupakan kelompok antibiotika yang dihasilkan oleh jamur *Streptomyces aureofaciens* atau *S. Rimosus*. Tetrasiklin merupakan derivat dari senyawa hidronaftalen, dan berwarna kuning (Subronto, 2001). Tetrasiklin merupakan antibiotika berspektrum luas yang aktif terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif yang bekerja merintangi sintesa protein (Tjay dan Rahardja, 2008).

1. Sifat Fisikakimia Tetrasiklin Hidroklorida (HCl)

Tetrasiklin HCl memiliki rumus molekul $C_{22}H_{24}N_2O_8$.HCl dengan berat molekul 480,90 dan nama kimia 4-(Dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-3,6,10,12,12a-pentahidroksi-6-metil-1,11-diokso-2-naftasenakarboksamida monohidroklorida. Pemeriannya berupa serbuk hablur, kuning; tidak berbau; agak higroskopis, mudah larut dalam air, larut dalam larutan alkali hidroksida dan dalam larutan karbonat; larut dalam metanol, etanol; praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter; bersifat stabil di udara tetapi pada pemaparan terhadap cahaya matahari yang kuat dalam udara lembab menjadi gelap. Dalam larutan dengan pH lebih kecil 2, potensi berkurang dan cepat rusak dalam larutan alkali hidroksida serta memiliki suhu lebur 214°C (Ditjen POM, 1995).

Tetrasiklin merupakan basa yang sukar larut dalam air, tetapi bentuk garam natrium atau garam HCl-nya mudah larut. Dalam keadaan kering, bentuk basa dan garam HCl tetrasiklin bersifat relatif stabil. Dalam larutan, kebanyakan tetrasiklin sangat labil (Gunawan, 2007).



Gambar 2. Rumus struktur tetrasiklin
(Sumber: Ditjen POM, 1995)

2. Mekanisme Kerja Tetrasiklin

Tetrasiklin bersifat bakteriostatik dengan jalan menghambat sintesis protein. Hal ini dilakukan dengan cara mengikat unit ribosom sel bakteri 30 S sehingga t-RNA tidak menempel pada ribosom yang mengakibatkan tidak terbentuknya amino asetil RNA. Antibiotik ini dilaporkan juga berperan dalam mengikat ion Fe dan ion Mg. Meskipun tetrasiklin dapat menembus sel mamalia, namun pada umumnya tidak menyebabkan keracunan pada individu yang menerimanya.

Ada 2 proses masuknya antibiotik ke dalam ribosom bakteri gram negatif, pertama yang disebut difusi pasif melalui kanal hidrofilik, kedua ialah sistem transport aktif. Setelah masuk maka antibiotik berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya tRNA-asam amino pada lokasi asam amino.

3. Pemakaian Tetrasiklin pada Ternak

Pada unggas (ayam, kalkun), tetrasiklin sering digunakan untuk pengobatan *Chronic Respiratory Disease* (CRD) atau ngorok, *air*

sacculitis, hexamitiasis dan *bleucomb*, sinusitis, dan sinivovitis dengan dosis 200-400 mg/galon air minum, sedangkan untuk pencegahan CRD diberikan dosis 100-200 mg/galon air minum (Subronto, 2011). Selain untuk pengobatan atau pencegahan penyakit pada ayam, tetrasiklin juga digunakan sebagai pemacu pertumbuhan (*antibiotic growth promotors*/AGP), selain antibiotika golongan penisilin, makrolida, linkomisin, dan *virginiamycin* (Angulo *et al.*, 2004).

Namun, akhir-akhir ini penggunaan senyawa antibiotik dalam pakan ternak telah menjadi perdebatan sengit oleh para ilmuwan akibat efek buruk yang ditimbulkan melalui residu yang ditinggalkan baik pada daging, susu, maupun telur. Contohnya tetrasiklin dapat menyebabkan gangguan kulit, *urticaria*, s*kin rash*, fotosensitivitas, muntah, diare, *shock anafilaktik* yang diikuti kematian. Efek yang timbul pada manusia akibat terdapat residu tetrasiklin pada produk ternak dapat dilihat pada Tabel 3.

Adapun waktu henti pemakaian antibiotik golongan tetrasiklin adalah lima (5) hari menjelang ternak dipotong (Lastari dkk., 1987) sehingga kalaupun masih terdapat residu di dalam ternak nilainya masih di bawah batas maksimal residu (BMR) yang diizinkan. Badan Standarisasi Nasional (BSN, 2000) menetapkan BMR yang tercantum dalam SNI 01-6366-2000 bahwa batas cemaran residu tetrasiklin yaitu 100 ppb pada daging.

Tabel 3. Efek yang ditimbulkan residu antibiotika

No.	Antibiotika	Penggunaan	Efek pada manusia
1	Penisilin	Anti infeksi Pemacu pertumbuhan	Alergi (gatal-gatal, demam)
2	Streptomisin	Anti infeksi	Gangguan pada susunan syaraf pusat/perifer seperti pusing-pusing, malaise, *hyperhydrosis*, shock anafilaktik, gangguan pada pendengaran dan vestibular serta gangguan keseimbangan, vertigo, dan ketulian.
3	Kloramfenikol	Anti infeksi	Menekan sumsum tulang, penyakit hati.
4	Ampisilin	Anti infeksi	Gangguan kulit, gangguan gastrointestinal (diare dan sakit perut), *urticaria*, hipotensi, dan palpitasi.
5	Tetrasiklin	Anti infeksi Pemacu pertumbuhan	Gangguan kulit, *urticaria*, s*kin rash*, fotosensitivitas, muntah, diare, *shock anafilaktik* yang diikuti kematian.

Sumber: Arifin, 1997

D. Analisis Residu Tetrasiklin

Analisis residu antibiotik golongan tetrasiklin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) telah dikembangkan oleh Muriurki *et al.* (2001) dan Suryani (2009). Muriurki menganalisis residu tetrasiklin dalam daging sapi dengan menggunakan detektor penangkap elektron dengan fase gerak metanol-asetonitril-asam oksalat 0,01 M (1:1,5:2,5) pada laju alir 2 ml/menit. Sementara Suryani (2009) menganalisis residu tetrasiklin dalam daging ayam pedaging dengan memanfaatkan detektor berkas fotodioda dengan fase gerak asam oksalat 0,0025 M-asetonitril (4:1) pada laju alir 1 ml/menit. Namun,

nilai perolehan kembali untuk tetrasiklin masih kurang baik yaitu 40,8-46,9% (di bawah 80%).

Berbeda dengan Christina (2011) yang melakukan penetapan kadar residu tetrasiklin dalam daging ayam pedaging secara adisi standar dengan spektrofotometri ultraviolet. Nilai perolehan kembali yang didapatkan baik yaitu 103,8225%. Keuntungan lain yang didapatkan dengan menggunakan spektrofotometri ultraviolet, yaitu kemudahan dalam penggunaan, relatif lebih murah dan sensitivitas yang baik. Namun, kelemahannya adalah perlu perlakuan awal untuk menghilangkan unsur-unsur pengganggu (Purwanto dan Ernawati, 2012).

1. Proses Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan bantuan pelarut sebagai tenaga pemisah. Tetrasiklin mampu berikatan dengan protein (membentuk konjugat) dan ion logam (membentuk khelat) sehingga sulit diekstraksi dari matriks biologi. Untuk melepaskan ikatan tersebut dapat dilakukan dengan mendenaturasi protein menggunakan pereaksi pengendap protein dengan penambahan etilendiamin tetra-asetat (EDTA), asam sitrat, suksinat, atau oksalat untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi (Botsoglou *and* Fletouris, 2001).

Sejak berkembangnya ilmu pengetahuan serta perhatian masyarakat terhadap lingkungan, maka mulai dikembangkan metode-metode analisis yang lebih ramah lingkungan, dikenal dengan istilah *green analytical*

chemistry (GAC). GAC mengembangkan teknologi analisis yang baru atau memodifikasi prosedur yang sudah ada dengan meminimalkan penggunaan bahan-bahan kimia berbahaya yang dapat mencemari lingkungan.

Salah satu tahapan metode analisis yang penting adalah persiapan sampel. Persiapan sampel bisa jadi merupakan tahapan yang paling besar kemungkinan terjadinya pencemaran lingkungan karena berhubungan langsung dengan sampel awal, sedangkan analit yang terdapat dalam sampel hanya dalam jumlah yang sangat kecil. Oleh karena itu, sering diperlukan penggunaan pelarut organik untuk memekatkan analit serta menghilangkan matriks pengganggu (Farre *et al.*, 2010).

Metode ekstraksi yang konvensional, seperti ekstraksi cair-cair (untuk sampel cair) dan sokletasi (untuk sampel padat) memiliki banyak kelemahan karena umumnya menggunakan pelarut yang banyak dan butuh sampel dalam jumlah besar, waktu analisis yang relatif lama dan biaya analisis cukup besar. Oleh karena itu, dikembangkan metode-metode ekstraksi diantaranya yaitu ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction*/SPE), ekstraksi-mikro fase padat (*Solid Phase Microextraction*/SPME), ekstraksi ultrasonik *(ultrasonic extraction)*, ekstraksi cair bertekanan (*Pressured Fluid Extraction*/PFE) (Zunlong, 2007), dan dispersi fase matriks padat (*Matrix Solid Phase Dispersion*/MSPD) (Barker, 2007). Metode-metode baru ini lebih cepat,

ramah lingkungan, bisa digunakan untuk analisis senyawa dalam jumlah kecil (sekelumit) dan mungkin biaya analisis pun menjadi lebih rendah.

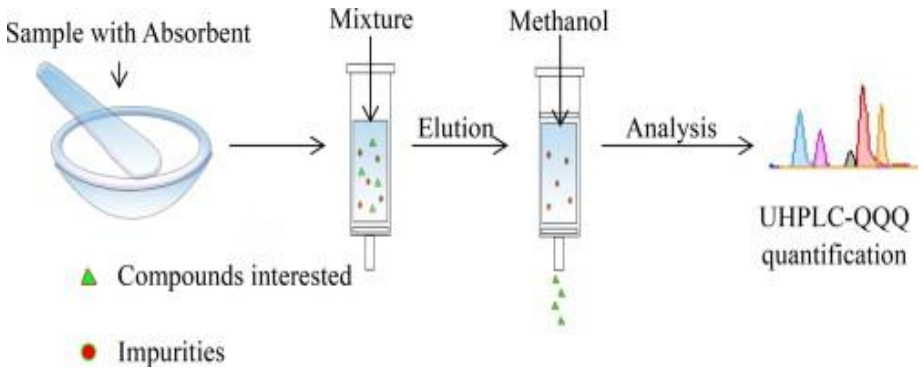
2. *Matrix Solid Phase Dispersion* (MSPD)

MSPD merupakan pengembangan dari teknik ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction*/SPE). MSPD adalah serangkaian proses analisis untuk persiapan, ekstraksi, dan fraksinasi sampel biologis padat, semi-padat, atau sampel dengan kekentalan yang tinggi. Teknik ini didasarkan pada pencampuran mekanis untuk menghasilkan disrupsi sampel dan interaksi matriks sampel dengan padatan pendukung yang terikat pada permukaan sampel (Barker, 2007).

Perbedaan utama MSPD dengan SPE adalah bahwa pada MSPD sampel terdispersi di seluruh kolom dan ditahan tidak hanya pada beberapa milimiter teratas dari kolom seperti yang mungkin terjadi pada kolom SPE (Kristenson *et al.*, 2006). Selain itu, disrupsi dan dispersi terjadi pada partikel dengan ukuran sangat kecil, sehingga dengan adanya luas permukaan yang besar meningkatkan interaksi fisika dan kimia komponen dari sistem. Ekstraksi akan menjadi lebih efektif dan efisien dengan MSPD. Pada SPE, disrupsi sampel harus dilakukan sebagai langkah terpisah dalam persiapan sampel dan banyak komponen sampel yang mungkin terbuang untuk membuat suatu kondisi yang cocok dalam kolom SPE (Barker, 2007).

Pada proses pengerjaan preparasi sampel dengan teknik MSPD, sampel cair, kental, semi-padat, atau padat ditempatkan dalam sebuah mortir

kaca dan dicampur dengan suatu padatan pendukung yang sesuai, seperti *octadecylsilyl* (ODS)-derivatif silika (C_{18}) menggunakan stamper kaca untuk mendisrupsi dan mendispersi sampel pada padatan pendukung. Banyaknya padatan pendukung yang digunakan tergantung pada jenis sampel. Umumnya, rasio sampel dan padatan pendukung berkisar antara 1:1 sampai 1:4. Setelah pencampuran selesai, sampel dapat dikemas ke kolom kosong atau di atas penjerap ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction*/SPE) baru kemudian dilakukan elusi dengan pelarut yang sesuai (Barker, 2007; Kristenson *et al.*, 2006).



Gambar 3. Langkah-langkah ekstraksi MSPD
(Sumber: Liu *et al.*, 2014)

Beberapa faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi MSPD, yaitu:

a. Rata-rata diameter partikel. Ukuran partikel yang diharapkan adalah partikel dengan ukuran yang sangat kecil (3-10 µm). Hal ini menyebabkan perpanjangan waktu elusi dan kebutuhan penambahan tekanan untuk mendapatkan aliran yang memadai.
b. Bahan yang digunakan sebagai padatan pendukung (*non-end-capped* atau *end-capped*) dengan kandungan karbon berkisar 8-18%.

c. Karakter dari fase terikat tergantung pada polaritas fase yang dipillih. Aplikasi yang memerlukan fase terikat yang bersifat lipofilik dapat menggunakan C_{18} atau C_8.
d. Penggunaan silika non-derivat atau padatan pendukung lainnya. Penggunaan bahan berbasis silika (silika derivat, silika gel, pasir, florisil telah digunakan dalam MSPD.
e. Rasio sampel dan padatan pendukung. Rasio yang paling sering digunakan adalah 1:4. Kebanyakan aplikasi menggunakan bahan fase terikat lipofilik (C_{18}, C_8), dengan mencampur 2 g padatan pendukung dengan 0,5 g sampel.
f. Modifikasi kimia dari matriks atau campuran matriks padatan pendukung. Penambahan agen pengkhelat, asam, basa, atau yang lainnya, pada saat pencampuran mempengaruhi distribusi dan elusi analit dari sampel.
g. Pemilihan pelarut dan urutan pelarut yang digunakan untuk diaplikasikan ke kolom. Kolom MSPD memungkinkan isolasi analit atau keseluruhan senyawa dalam sampel dengan menggunakan pelarut tunggal atau beberapa pelarut yang berbeda polaritas melewati kolom.
h. Volume kolom elusi. Kolom MSPD yang menggunakan 8 ml elusi dari pencampuran 2 g padatan pendukung dengan 0,5 g sampel biasanya analit target sudah dapat terelusi pada 4 ml pertama. Hal ini akan berbeda-beda untuk setiap aplikasi dan harus diperiksa untuk mengurangi penggunaan pelarut dan kemungkinan gangguan potensial (Barker, 2007).

Sampai saat ini, teknik MSPD telah digunakan untuk analisis senyawa-senyawa dalam kadar sangat kecil (renik), seperti obat, polutan organik dan senyawa-senyawa lain yang ada di lingkungan, sampel biologis, makanan, dan juga kosmetik (Brandsteterova *et al.*, 1997; Barker, 2000; Karasova *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012; Celeiro *et al.*, 2014). Sejauh ini, MSPD telah menunjukkan hasil yang konsisten dalam penggunaan pelarut (lebih hemat sekitar 95%) dan waktu analisis yang singkat (mengurangi 90% waktu analisis) dibandingkan dengan metode klasik (Barker, 2007). Penggunaan ukuran sampel yang lebih kecil, dikombinasikan dengan konsumsi pelarut yang lebih rendah, membuat MSPD patut dipertimbangkan sebagai alternatif ketika mengembangkan protokol analisis baru. Hal ini terutama untuk sampel padat atau semipadat bahan biologis.

E. Spektrofotometri Ultraviolet (Uv)

1. Teori Spektrofotometri Uv

Spektrofotometri ultraviolet adalah suatu teknik pengukuran serapan radiasi elektromagnetik yang diserap oleh zat pada daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm - 380 nm) (Ditjen POM, 1979). Radiasi ultraviolet diabsorpsi oleh molekul organik aromatik, molekul yang mengandung electron-π terkonjugasi dan/atau atom yang mengandung electron-n, menyebabkan transisi elektron di orbit terluarnya dari tingkat energi elektron dasar ke tingkat energi elektron tereksitasi lebih tinggi (Satiadarma, 2004).

Gugus atau atom dalam molekul organik yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak disebut kromofor (misalnya C=C, C=O, dan NO_2). Sedangkan auksokrom (misalnya –OH, $–NH_2$ dan $–OCH_3$) merupakan gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas sehingga mampu memberikan transisi $n \rightarrow \pi^*$. Terikatnya gugus ini pada gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih besar (pergeseran merah atau pergeseran batokromik) disertai dengan peningkatan intensitas (efek hiperkromik) (Gandjar dan Rohman, 2012).

Untuk mengukur banyaknya radiasi yang diserap oleh suatu molekul dapat dibuat suatu grafik (spektrum absorpsi) yang menghubungkan banyaknya sinar yang diserap dengan frekuensi (atau panjang gelombang) sinar. Transisi yang dibolehkan untuk suatu molekul dengan struktur kimia yang berbeda adalah tidak sama sehingga spektrum absorpsinya juga berbeda. Dengan demikian, spektrum absorpsi dapat digunakan sebagai bahan informasi yang bermanfaat untuk analisis kualitatif. Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi. Dengan demikian spektrum absorpsi juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif (Gandjar dan Rohman, 2012).

Pada penentuan analit yang terdapat dalam suatu matriks diperlukan pengukuran dari blangko matriks untuk meralat kesalahan yang disebabkan oleh matriks. Bila komponen matriks untuk blangko tidak

dapat diperoleh, maka dapat digunakan metode adisi standar, yaitu dengan menambahkan standar ke dalam larutan sampel yang diukur dengan konsentrasi yang meningkat secara teratur (Satiadarma, 2004).

2. Instrumentasi Spektrofotometer Ultraviolet (Uv)

Instrumentasi spektrofotometer Uv terdiri dari komponen-komponen pokok berikut ini.

a. Sumber radiasi

Sumber yang biasa digunakan yaitu lampu hidrogen atau deuterium untuk pengukuran UV (185-375 nm)

b. Monokromator

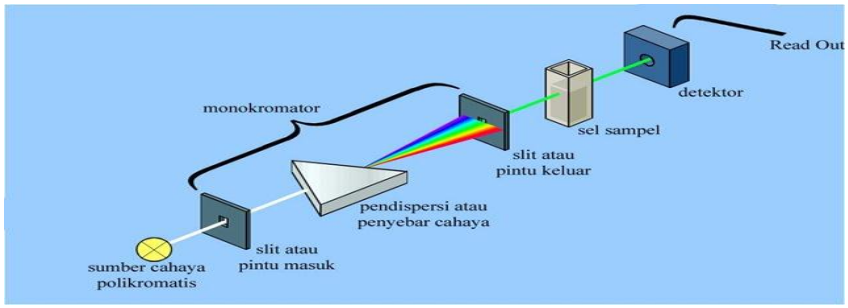
Monokromator digunakan untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis. Alatnya berupa prisma atau *grating*. Untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diinginkan dari hasil penguraian dapat digunakan celah.

c. Sel/kuvet

Pada pengukuran di daerah sinar Uv kita harus menggunakan kuvet kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Umumnya tebal kuvet adalah 1 cm, tetapi yang lebih kecil ataupun lebih besar dapat digunakan.

d. Detektor

Peranan detektor adalah memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang (Zhang, 2007).



Gambar 4. Diagram skematik spektrofotometer Uv *single-beam*
(Sumber: https://wanibesak.wordpress.com)

3. Analisis Kuantitatif secara Spektrofotometri Uv

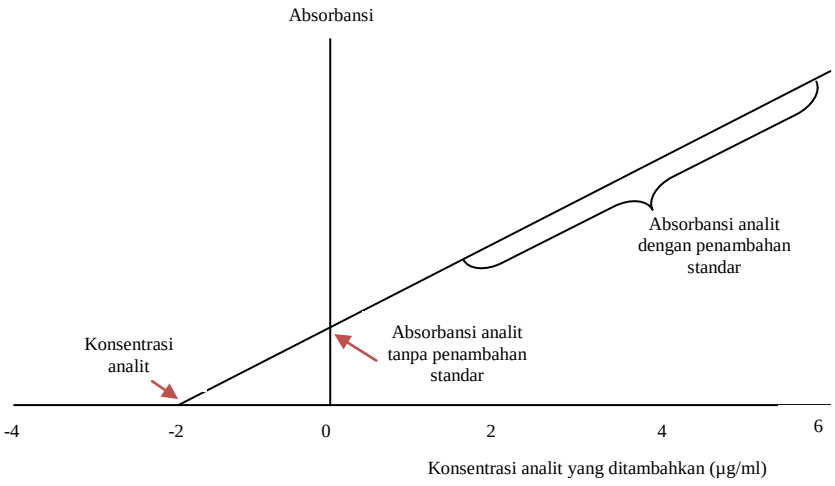
Spektra Uv dapat digunakan untuk informasi kualitatif dan sekaligus analisis kuantitatif. Dalam aspek kuantitatif, suatu berkas radiasi dikenakan pada cuplikan (larutan sampel) dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur besarnya. Apabila terdapat senyawa yang mengabsorpsi radiasi, maka akan terjadi pengurangan kekuatan radiasi yang mencapai detektor. Parameter kekuatan energi radiasi khas yang diabsorpsi oleh molekul adalah absorbansi (A) yang nilainya sebanding dengan banyaknya molekul yang mengabsorpsi radiasi. Senyawa yang tidak mengabsorpsi radiasi ultraviolet dapat juga ditentukan dengan spektroskopi ultraviolet-sinar tampak, apabila ada reaksi kimia yang dapat mengubahnya menjadi kromofor atau dapat disambungkan dengan suatu pereaksi kromofor (Satiadarma, 2004).

4. Metode Adisi Standar

Metode adisi standar dipakai secara luas karena mampu meminimalkan kesalahan yang disebabkan oleh perbedaan kondisi lingkungan (matriks) sampel dan standar. Idealnya kalibrasi standar seharusnya mendekati

komposisi dari sampel yang dianalisis, tidak hanya pada konsentrasi analit tetapi juga dalam hal konsentrasi dari elemen lain yang ada dalam matriks sampel, sehingga dapat meminimalkan pengaruh dari berbagai komponen dalam sampel terhadap absorbansi yang terukur (Skoog *et al.*, 1996). Pemanfaatan teknik adisi standar sangat membantu terutama untuk analisa senyawa yang kadarnya kecil (Ramette, 1981).

Dalam metode ini, sejumlah volume dari sampel dipindahkan ke dalam beberapa labu ukur. Satu larutan diencerkan sampai volume tertentu (tidak ditambah dengan larutan standar) kemudian larutan yang lain ditambahkan terlebih dahulu sejumlah larutan standar sehingga diperoleh serangkaian konsentrasi larutan standar. Kemudian larutan tersebut diukur, dan hasilnya dibuat grafik absorbansi versus konsentrasi standar yang ditambahkan.



Gambar 5. Grafik penentuan kadar dalam metode adisi standar (Sumber: Harris, 1987)

Seperti terlihat pada Gambar 5, sumbu X merupakan konsentrasi standar yang ditambahkan sementara sumbu Y menunjukkan nilai absorbansinya. Ekstrapolasi garis pada sumbu X (titik potong pada sumbu X, mensubstitusikan nilai Y = 0 pada persamaan regresi) inilah yang setara dengan konsentrasi analit (*concentration of unknown*) yang terkandung dalam larutan sampel yang diukur (Harris, 1987).

Berdasarkan hukum Beer akan berlaku hal-hal berikut:

Ax = k. Cx

At = k (Cs + Cx)

Keterangan: Cx = kadar zat sampel

Cs = kadar zat yang ditambahkan ke dalam larutan sampel

Ax = absorbansi zat sampel (tanpa penambahan standar)

At = absorbansi zat sampel + zat standar

Jika kedua rumus digabung maka diperoleh $Cx = Cs \times \frac{Ax}{At-Ax}$

Konsentrasi analit dalam sampel dapat dihitung dengan membuat grafik At lawan Cs seperti pada Gambar 4. Dengan mengekstrapolasi At = 0 pada grafik atau mensubstitusikan nilai Y = 0 (absorbansi = 0) akan diperoleh kadar analit dalam sampel, sehingga diperoleh:

$$Cx = Cs \times \frac{Ax}{0 - Ax}$$

$$Cx = Cs \times \frac{Ax}{-Ax}$$

$$Cx = -Cs$$ (Harris, 1987)

F. Validasi Metode

Menurut Standar Nasional Indonesia ISO/IEC 17025:2008 tentang Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi, validasi adalah konfirmasi melalui pengujian dan penyediaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus telah dipenuhi. Jadi validasi metode merupakan suatu proses yang menunjukkan bahwa prosedur analitik telah sesuai dengan penggunaan yang dikehendaki. Validasi dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis yang dilakukan akurat, spesifik, reprodusibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Menurut *United States of* Pharmacopeia (USP) ada 8 langkah dalam validasi metode analisis, yakni akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, linieritas dan rentang, kekasaran (*ruggedness*) dan ketahanan (*robutness*) (Gandjar dan Rohman, 2012).

1. Akurasi (kecermatan)

Akurasi (ketepatan) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*% recovery*) analit yang ditambahkan. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Miller *and* Miller, 2010) dengan perhitungan pada Persamaan (1).

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{A-B}{C} \times 100\% \qquad \text{..... (1)}$$

Keterangan :

A = konsentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan baku

B = konsentrasi sampel sebelum penambahan baku

C = konsentrasi baku yang ditambahkan

2. Presisi (keseksamaan)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku (standar deviasi/SD) atau simpangan baku relatif (standar deviasi relatif/RSD) (Miller *and* Miller, 2010).

Presisi dapat dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda, yaitu keterulangan (*repeatibility*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan yaitu presisi pada kondisi percobaan yang sama (berulang), baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya. Presisi antara adalah presisi pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya. Ketertiruan merujuk pada hasil-hasil dari laboratorium yang lain (Gandjar dan Rohman, 2012).

Simpangan baku atau standar deviasi (SD) merupakan akar jumlah kuadrat deviasi masing-masing hasil penetapan terhadap *mean* dibagi dengan derajat kebebasannya yang dinyatakan dalam Persamaan (2).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(\mathrm{x} - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad \text{..... (2)}$$

Keterangan :

X = nilai dari masing-masing pengukuran

$\overline{X}$ = rata-rata (mean) dari pengukuran

n = frekuensi penetapan

n-1= derajat kebebasan

Simpangan baku relatif atau standar deviasi relatif (RSD) merupakan ukuran ketepatan relatif yang umumnya dinyatakan dalam persen. RSD dirumuskan dengan persamaan (3).

$$RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100\% \qquad \text{..... (3)}$$

Keterangan :

RSD = *Relative Standard Deviation* (%)

S = *Standard Deviation*

$\overline{X}$ = rata-rata

3. Batas Deteksi (*limit of detection*/LOD)

Batas deteksi (*limit of detection*) merupakan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat terdeteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Batas deteksi dapat dihitung dengan Persamaan (4).

$$\text{Batas deteksi} = \frac{3 \times S(y/x)}{b} \qquad \text{..... (4)}$$

Keterangan :

S(y/x) = Simpangan baku residual

b = Slope

4. Batas Kuantitasi (*limit of* quantitation/LOQ)

Batas kuantitas (*limit of quantitation*) merupakan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Miller *and* Miller, 2010). Batas kuantitasi dihitungdengan menggunakan Persamaan (5).

$$\text{Batas kuantitasi} = \frac{10 \text{ x } S(y/x)}{b} \quad \text{..... (5)}$$

Keterangan :

S(y/x) = Simpangan baku residual

b = Slope

5. Spesifisitas (selektivitas)

Spesifisitas dari suatu metode analisis adalah kemampuannya untuk mengukur analit secara khusus dengan akurat, disamping komponen lain yang terdapat dalam matriks sampel. Spesifisitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya (Miller *and* Miller, 2010).

6. Linieritas dan Rentang

Linieritas suatu metode analisis adalah kemampuan untuk menunjukkan bahwa nilai hasil uji langsung untuk setelah diolah secara matematika,

proporsional dengan konsentrasi analit dalam sampel batas rentang konsentrasi tertentu. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan akurasi, presisi, dan linieritas yang dapat diterima (Harmita, 2004).

Linieritas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Pengujian linieritas secara matematik melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit (Miller *and* Miller, 2010) melalui Persamaan (6).

$$y = ax + b \qquad \text{..... (6)}$$

Keterangan :

y = absorban kurva kalibrasi

x = kadar larutan standar

b = slope

a = intercept

7. Kekasaran (*ruggedness*)

Kekasaran/ketangguhan metode merupakan tingkat reprodusibilitas hasil yang diperoleh di bawah kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai standar deviasi relatif (RSD). Kondisi-kondisi ini meliputi laboratorium, analis, alat, reagen, dan waktu percobaan yang berbeda. Kekasaran suatu metode mungkin tidak diketahui jika suatu

metode dikembangkan pertama kali, akan tetapi kekasaran suatu metode akan kelihatan jika digunakan berulang kali (Gandjar dan Rohman, 2012).

8. Ketahanan (*robutness*)

Ketahanan merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode, seperti persentase pelarut organik, pH, kekuatan ionik, suhu, dan sebagainya (Gandjar dan Rohman, 2012).