

III. METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif yang mengarah pada pengembangan metode dengan tujuan mengembangkan spektrofotometri ultraviolet secara adisi standar menggunakan teknik ekstraksi MSPD dalam penetapan residu tetrasiklin dalam daging ayam pedaging.

A. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei - Oktober 2015.

2. Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Medik Universitas Malahayati.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan, antara lain alat-alat gelas laboratorium, mortir dan stamper, spektrofotometer Uv (Shimadzu Uv 1800), blender, *syringe* volume 20 ml dan 10 ml, *vacuum manifold*, sonikator, neraca analitik, spatula dan *bulb*.

2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan, yaitu asam klorida p.a. (*pro analysis*) (E. Merck), n-heksana p.a. (*pro analysis*) (E. Merck), diklorometana p.a.

(*pro analysis*) (E. Merck), metanol p.a. (*pro analysis*) (E. Merck), asam oksalat dihidrat p.a. (*pro analysis*) (E. Merck), dinatrium edetat p.a. (*pro analysis*) (E. Merck), etilasetat p.a. (*pro analysis*) (E. Merck), asetonitril p.a. (*pro analysis*) (E. Merck), ODS (C₁₈), tetrasiklin hidroklorida baku (BPFI), air suling (Brataco), daging ayam pedaging.

C. Pengambilan Sampel

Sampel yang diperiksa dalam penelitian ini adalah daging ayam pedaging bagian paha yang dijual di tiga pusat perbelanjaan di Kota Bandar Lampung, yaitu *Hypermart (Central Plaza)*, *Chandra (Chandra Supermarket & Department Store Tanjung Karang)*, dan *Giant (Giant Antasari)* yang kemudian disebut sampel A, B, dan C. Sampel yang diambil dalam kondisi segar (bukan daging beku atau yang sudah diolah) kemudian dibersihkan (dibuang kulit dan tulang) dan disimpan dalam lemari pendingin. Sebelum digunakan untuk pemeriksaan, sampel terlebih dahulu dihaluskan dengan blender.

D. Prosedur Penelitian (Christina, 2011; Brandsteterova, 1997)

1. Pembuatan Pereaksi

a. Larutan HCl 0,1 N

Sebanyak 8,4 ml HCl pekat diencerkan dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml hingga garis tanda.

b. ase gerak etilasetat : asetonitril (3:1)

Etilasetat sebanyak 75 ml dicampurkan dengan asetonitril dalam labu ukur 100 ml hingga garis tanda.

2. Pembuatan Larutan Standar Tetrasiklin HCl BPFI

Sejumlah lebih kurang 25,0 mg tetrasiklin hidroklorida (HCl) BPFI ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N lalu dicukupkan sampai garis tanda dan dikocok homogen, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, larutan ini disebut larutan standar 1 (LS I). Dari larutan ini dipipet 5,00 ml, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, lalu diencerkan dengan HCl 0,1 N sampai garis tanda sehingga diperoleh konsentrasi 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (LS II).

3. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum

Sejumlah 5,00 ml LS II dipipet, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, kemudian diencerkan dengan HCl 0,1 N sampai garis tanda. Lalu dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kemudian diukur serapan pada panjang gelombang 200-400 nm.

4. Ekstraksi Sampel

ODS sebagai adsorben dimasukkan dalam suatu *syringe* dengan volume 20 ml. Bilas dengan n-heksan dengan jumlah dua kali dari volume adsorben. Lalu bilas dengan diklorometana dengan volume dua kali banyaknya adsorben, terakhir bilas lagi dengan metanol juga dengan volume yang sama. Kemudian keringkan dengan menggunakan vakum.

Adsorben yang telah dicuci tadi ditimbang sebanyak 4,0 g. Kemudian ditambahkan 50 mg asam oksalat dan 50 mg Na₂EDTA, lalu campurkan.

Sampel yang telah dihaluskan sebanyak 1,0 g dihomogenisasi dengan campuran adsorben tadi dengan menggunakan mortir dan stamper.

Campuran sampel-adsorben dimasukkan ke dalam *syringe* dengan volume 10 ml lalu tekan *cartridge* sampai tanda menunjukkan volume 4,5 ml. Selanjutnya bilas dengan 10 ml n-heksan. Setelah itu dilakukan elusi dengan menggunakan campuran etilasetat dan asetonitril (3:1) sebanyak 25 ml. Eluat yang dihasilkan kemudian digunakan untuk analisis menggunakan spektrofotometer Uv.

5. Optimasi Prosedur Ekstraksi

Optimasi dilakukan untuk rasio sampel dan adsorben dengan variasi 1: 2; 1:3; dan 1:4 pada sampel A. Penentuan rasio sampel dan adsorben yang akan digunakan untuk penentuan kadar residu tetrasiklin dalam sampel didapatkan dengan menghitung nilai perolehan kembali (%) tetrasiklin baku yang ditambahkan pada sampel. Hasil perolehan kembali yang terbesar yang kemudian rasio sampel dan adsorbennya digunakan untuk prosedur ekstraksi kedua sampel lainnya (sampel B dan C).

6. Penentuan Kadar Residu Tetrasiklin dalam Daging Ayam Pedaging

Sebanyak masing-masing 4,00 ml larutan sampel dipipet ke dalam 5 labu ukur 25 ml, tambahkan berturut-turut 0,00; 2,50; 3,75; 5,00; dan 6,25 ml LS II, cukupkan dengan HCl 0,1 N hingga garis tanda sehingga diperoleh masing-masing larutan tetrasiklin baku dengan konsentrasi 0,0; 5,0; 7,5; 10,0; dan 12,5 μ g/ml. Absorbansi dari masing-masing larutan diukur

pada panjang gelombang serapan maksimum kemudian dibuat grafik absorbansi versus konsentrasi standar.

Dengan mengekstrapolasikan garis pada sumbu X (garis memotong sumbu X) atau mensubstitusikan absorbansi (Y) = 0 pada persamaan regresi yang diperoleh maka akan diperoleh konsentrasi residu tetrasiklin dalam larutan sampel yang diukur (Cx). Hasilnya lalu dikali faktor pengenceran (6,25) dan volume larutan sampel (25 ml) kemudian dibagi berat penimbangan sampel daging ayam sehingga diperoleh kadar residu tetrasiklin dengan satuan $\mu\text{g}/\text{ml}$ sampel.

Rumus perhitungan kadar residu tetrasiklin dalam sampel seperti pada Persamaan (7).

Kadar residu tetrasiklin dalam sampel (mg/kg)

$$= \frac{Cx (\mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{Faktor pengenceran} \times \text{Volume larutan sampel (ml)}}{\text{Berat penimbangan sampel (g)}} \quad \dots \dots \dots (7)$$

7. Analisis Data Penetapan Kadar Secara Statistik

Data perhitungan kadar residu tetrasiklin dianalisis secara statistik menggunakan uji t. Rumus yang digunakan untuk menghitung simpangan baku adalah persamaan (2). Sedangkan untuk mendapatkan t_{hitung} digunakan Persamaan (8).

$$t_{\text{hitung}} = \frac{X_i - \bar{X}}{SD/\sqrt{n}} \quad \dots \dots \dots (8)$$

Data diterima jika $-t_{\text{tabel}} < t_{\text{hitung}} < t_{\text{tabel}}$ pada interval kepercayaan 95% dengan nilai $\alpha = 0,05$.

Untuk menghitung kadar residu tetrasiklin dalam sampel secara statistik digunakan Persamaan (9).

$$\text{Kadar residu tetrasiklin} = \bar{X} \pm (t \times \text{SD}/\sqrt{n}) \quad \dots \dots \dots \quad (9)$$

Keterangan:

SD = *standard deviation/simpangan baku*

X_i = kadar residu tetrasiklin

\bar{X} = kadar rerata residu tetrasiklin

n = jumlah pengulangan

t = harga t_{tabel} sesuai derajat kepercayaan

8. Uji Validasi

a. Uji akurasi dengan persen perolehan kembali

Akurasi ditentukan dengan menggunakan metode adisi standar, yakni ke dalam sampel daging ayam ditambahkan tetrasiklin HCl baku sebanyak 100% dari kadar tetrasiklin yang diketahui terdapat dalam sampel, kemudian dianalisis dengan prosedur yang sama seperti pada sampel. Hasil dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*% recovery*). Persen perolehan kembali dapat dihitung dengan menggunakan Persamaan (1).

b. Uji presisi

Presisi metode penelitian dinyatakan oleh simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation/RSD*) dari serangkaian data uji perolehan kembali. RSD dihitung dengan menggunakan Persamaan (3).

c. Batas deteksi (*limit of detection/LOD*)

Batas deteksi dihitung dengan Persamaan (4).

d. Batas kuantitasi (*limit of quantitation/LOQ*)

Batas kuantitasi dihitung dengan rumus seperti yang tertulis pada Persamaan (5).

e. Linieritas

Linieritas 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) seperti tertulis pada Persamaan (6).