

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR RESIDU
ANTIBIOTIK TETRASIKLIN PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)
DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

(Skripsi)

Oleh

YANESTA OXVYENA

NPM 1817011003



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

OPTIMASI DAN VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR RESIDU ANTIBIOTIK TETRASIKLIN PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Oleh

YANESTA OXVYENA

Telah dilakukan penelitian tentang validasi metode penentuan kadar residu antibiotik tetrasiklin pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Metode KCKT digunakan dalam analisis karena memiliki kelebihan, seperti akurat, efektif, efisien, mudah dalam pengoperasian, serta selektivitas dan sensitivitasnya tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode penentuan residu tetrasiklin dan mengetahui kadar residu antibiotik tetrasiklin dalam daging ikan mas dengan KCKT yang diperoleh dari 8 pasar di Kota Bandar Lampung. Optimasi metode analisis yang dilakukan adalah optimasi komposisi dan laju alir fase gerak. Hasil optimasi menunjukkan komposisi asetonitril : air = 35 : 65 dan laju alir 0,5 mL/menit. Parameter validasi metode yang dilakukan pada penelitian ini adalah linearitas, presisi, akurasi, selektivitas, LoD dan LoQ. Hasil linearitas yang diperoleh dari penelitian ini adalah $r = 0,9980$. Metode ini memiliki presisi *repeatability* dengan nilai %RSD 1,35% dan presisi *reproducibility* dengan nilai %RSD berturut-turut 1,11%; 0,96%; dan 1,14%. Nilai %*recovery* metode sebesar 101,05%. Nilai LoD dan LoQ metode ini sebesar 0,27 ppm dan 0,90 ppm. Pengukuran kadar residu antibiotik tetrasiklin dan nilai ketidakpastiannya pada sampel ikan mas dari 8 lokasi pasar di Bandar Lampung menunjukkan nilai sebesar $29,28 \pm 1,12$ ppm; $21,77 \pm 1,07$ ppm; $32,70 \pm 1,23$ ppm; $21,89 \pm 0,87$ ppm; $32,10 \pm 1,21$ ppm; $38,58 \pm 1,42$ ppm; $23,13 \pm 0,91$ ppm; dan $24,70 \pm 0,97$ ppm. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode tersebut dapat digunakan untuk analisis kadar antibiotik tetrasiklin secara rutin di laboratorium.

Kata kunci: Validasi metode, KCKT, antibiotik tetrasiklin, kadar, ketidakpastian pengukuran

ABSTRACT

OPTIMIZATION AND METHOD VALIDATION FOR DETERMINATION THE RESIDUE LEVELS OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN CARP (*Cyprinus carpio*) WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

By

YANESTA OXVYENA

The method validation for determination the residue levels of tetracycline antibiotics in carp (*Cyprinus carpio*) has been carried out using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The advantages of the HPLC method are accurate, effective, efficient, easy to operate, and has high selectivity and sensitivity. The research purposes is to expand a method for determining tetracycline residues and to determine the residual levels of tetracycline antibiotics in carp from 8 markets in Bandar Lampung City using HPLC. The method optimization carried out are mobile phase composition and flow rate. The optimization results show the composition of acetonitrile : water = 35 : 65 and a flow rate of 0.5 mL/minute. Parameters used in this research are linearity, precision, accuracy, selectivity, LoD and LoQ. The linearity result obtained is $r = 0.9980$. This method has repeatability precision with %RSD value 1,35% and reproducibility precision with %RSD value 1,11%; 0,96%; and 1,14% respectively. The value of % recovery method is 101,05%. The LoD and LoQ values of this method are 0,27 ppm and 0,90 ppm. Measurement value of tetracycline antibiotic residue levels and their uncertainty values in carp samples from 8 market locations in Bandar Lampung are of $29,28 \pm 1,12$ ppm; $21,77 \pm 1,07$ ppm; $32,70 \pm 1,23$ ppm; $21,89 \pm 0,87$ ppm; $32,10 \pm 1,21$ ppm; $38,58 \pm 1,42$ ppm; $23,13 \pm 0,91$ ppm; dan $24,70 \pm 0,97$ ppm. The method validation results indicate that this method can be used for routine analysis of tetracycline antibiotic levels in the laboratory.

Keywords: Method validation, HPLC, tetracycline antibiotics, levels, measurement uncertainty

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR RESIDU
ANTIBIOTIK TETRASIKLIN PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)
DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Oleh

YANESTA OXVYENA

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

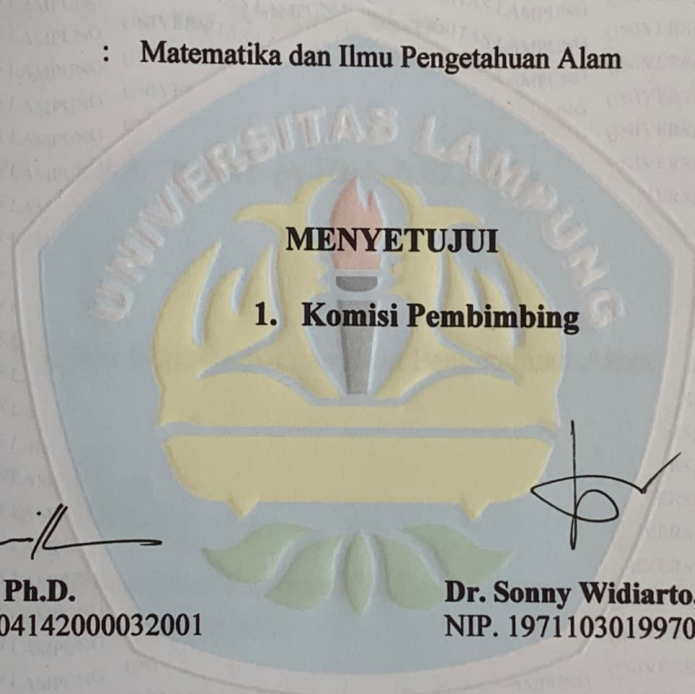
**Judul : OPTIMASI DAN VALIDASI METODE PENENTUAN
KADAR RESIDU ANTIBIOTIK TETRASIKLIN PADA
IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) DENGAN KROMATOGRAFI
CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Nama : Yanesta Oxvyena

NPM : 1817011003

Jurusan : Kimia

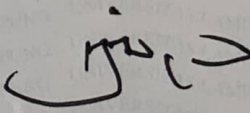
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Rinawati, Ph.D.
NIP. 197104142000032001

Dr. Sonny Widiarto, M.Sc.
NIP. 197110301997031003

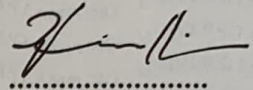
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

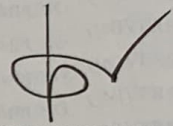
1. Tim Penguji

Ketua : Rinawati, Ph.D.



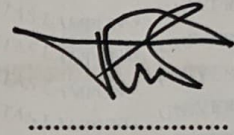
.....

Sekretaris : Dr. Sonny Widiarto, M.Sc.



.....

Anggota : Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc.



.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Satripto Dwi Yuwono, M.T.

NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 03 Agustus 2022

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Yanesta Oxvyena
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011003
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang berjudul :

“Optimasi dan Validasi Metode Penentuan Kadar Residu Antibiotik Tetrasiklin pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)”

Adalah benar karya sendiri dan saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Bandar Lampung, 12 Agustus 2022
Yang bertanda tangan,



Yanesta Oxvyena
NPM. 1817011003

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Kotaagung pada tanggal 10 Oktober 1999 sebagai anak kedua dari Bapak Rohimi dan Ibu Nerry Agustina. Penulis telah menyelesaikan pendidikan di TK Sriwijaya pada tahun 2006, SDN 1 Sukarame pada tahun 2012, SMPN 19 Bandar Lampung pada tahun 2015, dan SMAN 5 Bandar Lampung pada tahun 2018.

Pada tahun 2018, penulis diterima sebagai mahasiswi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada tahun 2018 melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri). Selama menjadi mahasiswi di Jurusan Kimia, penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Analitik I pada tahun 2021 dan 2022, serta tutor Kimia Analitik III pada tahun 2022. Penulis juga aktif berorganisasi di Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) sebagai anggota Bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi periode 2019, serta sebagai Sekretaris Bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi pada periode 2020. Pada tahun 2021 penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan yang berjudul Verifikasi Metode Penentuan Kadar Klorida Pada Air Bersih dengan Metode Argentometri Berdasarkan SNI 06-6989.19-2004 Di PDAM Way Rilau Bandar Lampung.

MOTO

Perbanyak bersyukur, kurangi mengeluh. Kamu tidak bisa kembali ke masa lalu atau mempercepat masa depan. Nikmati setiap langkah dalam hidup dan terus berproses. Berpetuanglah!

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras dan hanya kepada Tuhanmu lah kamu berharap.

(Q.S. Al-Insyirah : 6-8)

Dengan segala kerendahan hati dan rasa syukur kepada Allah SWT
kupersembahkan skripsi ini kepada: Bapakku, Mamaku, dan Kakakku tersayang
yang telah memberikan doa, motivasi, semangat, dan kasih sayang yang tiada
hentinya

Orang-orang yang telah menyayangi, membantu, memberikan semangat dan yang
telah menuliskan cerita dalam kehidupanku

Teman-Teman Seperjuangan Kimia

Dan almamater tercinta, Universitas Lampung

SANWACANA

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas segala nikmat, karunia, dan berkah-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan oleh penulis. Skripsi dengan judul “Optimasi dan Validasi Metode Penentuan Kadar Residu Antibiotik Tetrasiklin pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)” merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa untuk menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari arahan, bimbingan, motivasi, serta berbagai bantuan dari pihak-pihak lain. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Rinawati, Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama yang senantiasa sabar untuk selalu membimbing, mengarahkan, memotivasi, memberikan ilmu pengetahuan serta saran kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan ridho-Nya dan membalas semua kebaikan ibu yang tulus.
2. Bapak Dr. Sonny Widiarto, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Kedua yang senantiasa membimbing, meluangkan waktunya, memberikan nasihat dan juga saran kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan kritik, saran, dan ilmu yang bermanfaat untuk penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa mengarahkan dan memotivasi penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.

5. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia yang senantiasa mendukung penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Seluruh dosen dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
7. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung, beserta jajarannya.
8. Kepala dan seluruh karyawan Laboratorium Terpadu Sentra dan Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung.
9. Kak Romando, Mba Lina, Kak Purna, dan analis lainnya di Laboratorium Terpadu Sentra dan Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung.
10. Kedua orang tuaku yang terkasih, Bapak Rohimi dan Ibu Nerry Agustina yang telah memberikan limpahan doa, kasih sayang, usaha, dan motivasi yang tiada hentinya kepada penulis sehingga penulis dapat dipermudah dan senantiasa diberikan kelancaran oleh Allah SWT. Semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan, rezeki, dan kenikmatan dunia serta akhirat kepada kalian. *Aamiin Allahumma aamiin.*
11. Kakakku Ronerson dan adikku Reyzel Heavenly Stiadi yang telah membantu, memberikan saran, memotivasi dan mendoakan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan studi. Semoga Allah SWT selalu memberikan perlindungan, diberi kesehatan, dan kemudahan kepada kalian. *Aamiin Allahumma aamiin.*
12. Orang terbaik Dwiki Mafrido yang selalu menghibur, memotivasi dan memberikan nasihat kepada penulis.
13. Sahabat-sahabat tercintaku yaitu Yumna Mahira, Eva Yanti, dan Yolanda Sari yang selalu mendukung meskipun dalam jarak jauh.
14. Sahabat-sahabat “US”ku tercinta yaitu Hendun Naura Syifa, Shela Mega Putri, Titin Na’afiah, dan Winona Putri Prihadita.
15. Sahabat-sahabat Helikopter-Helikopter yaitu Salsabila, Salsabilla Bethari Purworini, dan Vezhia Sheiscatamya yang selalu ada, membantu dan menemani penulis dalam keadaan apapun.
16. Teman-teman *Rinawati’s research* yaitu Savira Olga Kistianti, Polado Xanana, dan Sania Mirelda Sari yang senantiasa membantu dari awal

penelitian. Semoga segala usaha, canda, tawa, kenangan dalam penelitian ini akan selalu teringat oleh kita semua.

17. Teman-teman *ex*-Pimpinan Himaki 2020 yang senantiasa hadir memberikan motivasi kepada penulis.
18. Teman-teman Bidang KPO Himaki 2020 yang selalu mendukung penulis.
19. Teman-teman seperjuangan Kimia angkatan 2018 yang tidak bisa disebut satu persatu, semoga kita semua selalu dipermudah dan jangan saling melupakan di masa depan. Tetap totalitas, berkualitas dan tanpa batas!
20. Adik-adik angkatan 2019, 2020, dan 2021 yang tidak bisa disebut satu persatu, semoga lekas menyelesaikan pendidikan ini dan kita semua menjadi orang yang sukses.

Bandar Lampung, 12 Agustus 2022

Penulis

Yanesta Oxvyena

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>).....	5
2.1.1 Klasifikasi Ikan Mas	5
2.1.2 Morfologi dan Jenis-Jenis Ikan Mas.....	6
2.1.3 Habitat Ikan Mas.....	7
2.1.4 Penyakit Pada Ikan Mas.....	8
2.2 Antibiotik.....	8
2.2.1 Antibiotik Tetrasiklin.....	10
2.2.2 Dampak Residu Antibiotik	12
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	13
2.3.1 Instrumentasi KCKT	17
2.3.2 Parameter KCKT	20
2.3.3 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif KCKT	24
2.4 Validasi Metode.....	27
2.4.1 Presisi (Ketelitian)	27
2.4.2 Akurasi (Kecermatan).....	29
2.4.3 Linearitas	31
2.4.4 Selektivitas.....	32
2.4.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi.....	33
2.5 Ketidakpastian Pengukuran	34

2.5.1 Ketidakpastian Gabungan (μ_c).....	36
2.5.2 Ketidakpastian Diperluas (U)	36

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat.....	37
3.2 Alat dan Bahan	37
3.3 Prosedur Penelitian	38
3.3.1 Pengumpulan Sampel	38
3.3.2 Pembuatan Larutan	38
3.3.3 Tahap Preparasi.....	39
3.3.4 Optimasi KCKT	40
3.3.5 Uji Validasi Metode.....	41
3.3.6 Ketidakpastian Pengukuran	42
3.3.7 Penentuan Kadar Residu Tetrasiklin pada Daging Ikan Mas	42

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....

4.1 Lokasi Pengambilan Sampel	44
4.2 Optimasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	45
4.2.1 Optimasi Komposisi Fase Gerak.....	45
4.2.2 Optimasi Laju Alir Fase Gerak	48
4.3 Validasi Metode	50
4.3.1 Linearitas	51
4.3.2 Presisi	52
4.3.3 Akurasi	54
4.3.4 Selektivitas	56
4.3.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi	57
4.4 Ketidakpastian Pengukuran	58
4.4.1 Ketidakpastian Baku dari Massa Sampel	59
4.4.2 Ketidakpastian Baku dari Labu Ukur 10 mL	60
4.4.3 Ketidakpastian Baku dari Labu Ukur 5 mL	61
4.4.4 Ketidakpastian Baku dari Mikropipet 1 mL.....	62
4.4.5 Ketidakpastian Baku dari Kemurnian Standar Tetrasiklin.....	62
4.4.6 Ketidakpastian Baku dari Faktor Pengenceran	63
4.4.7 Ketidakpastian Baku dari Kurva Kalibrasi.....	64
4.4.8 Ketidakpastian Baku dari Presisi <i>Repeatability</i>	65

4.4.9 Ketidakpastian Gabungan Penentuan Kadar Residu Antibiotik Tetrasiklin	66
4.4.10 Ketidakpastian Diperluas	68
4.5 Penentuan Kadar Residu Antibiotik Tetrasiklin pada Sampel	70
4.6 Perbandingan Metode Analisis Penentuan Kadar Residu Tetrasiklin pada Ikan Mas	72

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	74
5.2 Saran.....	75

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN.

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kriteria ikan mas Majalaya dan Sinyonya	7
2. Keterangan komponen R_1 , R_2 dan R_3 pada Gambar 2	11
3. Indeks polaritas dan karakteristik beberapa pelarut KCKT	15
4. Batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz	28
5. Rentang maksimum yang diperbolehkan	29
6. Persyaratan presisi dan % <i>recovery</i>	30
7. Kondisi awal instrumen KCKT.....	40
8. Nilai parameter optimasi komposisi fase gerak	47
9. Nilai parameter optimasi laju alir.....	49
10. Hasil presisi <i>repeatability</i> pada sampel ikan mas	53
11. Hasil presisi <i>reproducibility</i> pada sampel ikan mas.....	54
12. Hasil pengukuran akurasi pada sampel ikan mas.....	55
13. Sumber ketidakpastian kurva kalibrasi	64
14. Nilai ketidakpastian dari kurva kalibrasi	65
15. Nilai ketidakpastian baku dari presisi <i>repeatability</i>	66
16. Sumber ketidakpastian kadar residu antibiotik tetrasiklin dalam sampel ikan mas	67
17. Nilai ketidakpastian gabungan	68
18. Nilai ketidakpastian diperluas	69
19. Hasil pengukuran kadar residu antibiotik tetrasiklin pada sampel ikan mas ..	71

20. Perbandingan metode analisis dengan KCKT dan Spektrofotometri UV.....	72
21. Perbandingan kadar residu antibiotik tetrasiklin pada sampel ikan mas.....	73
22. Penentuan persamaan regresi	89
23. Penentuan konsentrasi untuk presisi <i>repeatability</i>	91
24. Penentuan konsentrasi untuk presisi <i>reproducibility</i> hari ke-1	93
25. Penentuan konsentrasi untuk presisi <i>reproducibility</i> hari ke-2	95
26. Penentuan konsentrasi untuk presisi <i>reproducibility</i> hari ke-3	97
27. Penentuan konsentrasi untuk akurasi	99
28. Penentuan nilai LoD dan LoQ	101
29. Data hasil ketidakpastian pengukuran.....	102
30. Standar relatif kurva kalibrasi	105
31. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Rajabasa.....	105
32. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Untung	106
33. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Way Kandis	106
34. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Way Halim.....	106
35. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Cimeng	107
36. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Tugu.....	107
37. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Bambu Kuning.....	108
38. Hasil pengukuran sampel dari Pasar Sukarame	108
39. Sumber ketidakpastian pengukuran kadar residu antibiotik tetrasiklin dalam sampel.....	111
40. Penentuan kadar tetrasiklin pada sampel ikan mas	116

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) (Thomas, 2000).....	6
2. Struktur kelompok tetrasiklin (Orlando <i>and</i> Simionato, 2013)	11
3. Seperangkat alat KCKT	14
4. Kromatografi fase normal (Biomall, 2009).....	16
5. Kromatografi fase terbalik (Biomall, 2009).....	16
6. Sistem kromatografi cair kinerja tinggi (Anastasia, 2011)	17
7. Struktur kolom C18.....	19
8. Bentuk puncak yang mungkin terjadi pada KCKT (Meyer, 2010).....	23
9. Perhitungan TF suatu puncak kromatogram (Hansen <i>et al.</i> , 2012).....	23
10. Residual plot hasil pengukuran larutan standar (Osborne <i>and</i> Waters, 2002) 32	
11. Posisi LoD, LoQ dan rata-rata sinyal (Riyanto, 2014).....	34
12. Diagram alir penelitian.....	43
13. Peta lokasi pengambilan sampel	44
14. Kromatogram standar tetrasiklin komposisi asetonitril : air (30:70)	46
15. Kromatogram standar tetrasiklin komposisi asetonitril : air (35:65)	46
16. Kromatogram standar tetrasiklin komposisi asetonitril : air (40:60)	47
17. Kromatogram standar tetrasiklin laju alir 0,5 mL/menit.....	48
18. Kromatogram standar tetrasiklin laju alir 1 mL/menit.....	49
19. Kromatogram standar tetrasiklin laju alir 1,5 mL/menit.....	49

20. Kurva kalibrasi larutan standar tetrasiklin	51
21. Residual plot larutan standar tetrasiklin	52
22. Kromatogram larutan standar tetrasiklin murni	56
23. Kromatogram larutan standar tetrasiklin campuran	57
24. Diagram tulang ikan penentuan kadar antibiotik tetrasiklin	59
25. Diagram kontribusi dari sumber-sumber ketidakpastian	69
26. Kurva kalibrasi larutan standar tetrasiklin	90
27. Kurva kalibrasi presisi <i>repeatability</i>	91
28. Kurva kalibrasi presisi <i>reproducibility</i> hari ke-1	93
29. Kurva kalibrasi presisi <i>reproducibility</i> hari ke-2	95
30. Kurva kalibrasi presisi <i>reproducibility</i> hari ke-3	97
31. Kurva kalibrasi akurasi	99
32. Diagram tulang ikan	102
33. Kurva kalibrasi penentuan kadar tetrasiklin pada sampel	116

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya ikan mas merupakan budidaya ikan air tawar yang saat ini berkembang pesat dalam masyarakat Indonesia. Ikan mas banyak dibudidayakan karena memiliki keunggulan seperti rasa daging yang enak, gurih, mengandung protein yang tinggi, serta mudah beradaptasi di lingkungan perairan Indonesia. Tidak hanya jenis ikan mas konsumsi, tetapi ikan mas hias juga banyak dibudidayakan. Namun, pada proses pengembangannya budidaya ikan mas sering menghadapi kendala salah satunya terkena serangan penyakit, sehingga diperlukan penggunaan antibiotik (Nurhasnawati dkk., 2016; Limbong dan Limbong, 2018). Antibiotik dianggap sebagai obat antimikroba yang dapat menekan atau menghentikan pertumbuhan bakteri sehingga pertumbuhan produksi perikanan dapat meningkat (Tjay dan Rahardja, 2007).

Konsumsi antibiotik di dunia berkisar antara 100.000 hingga 200.000 ton per tahun, dengan sekitar 50% digunakan untuk kedokteran dan sebagai pengontrolan serangan penyakit pada hewan maupun tumbuhan (Van Boeckel *et al.*, 2014). Penggunaan antibiotik harus diberikan dalam dosis yang tepat terhadap ikan mas yang terkena penyakit untuk mencegah timbulnya resistensi terhadap bakteri penyebab penyakit ikan dan mencegah efek samping bagi lingkungan (Wibowo dkk., 2010; Martínez, 2017). Antibiotik yang cukup sering digunakan pada budidaya perikanan adalah tetrasiklin, yaitu sekitar 60% dari total keseluruhan penggunaan antibiotik (Sekkin *and* Kum, 2011). Tetrasiklin adalah kelompok antibiotika yang dihasilkan oleh *S. aureofaciens* atau *S. rimosus*. Antibiotik tetrasiklin ini memiliki kelebihan seperti mudah didapat, harganya murah, memiliki kualitas tinggi dan mengandung aktivitas mikroba yang luas, sehingga

sering digunakan dalam pengobatan medis manusia, industri peternakan, budidaya perikanan, dan industri pertanian (Pawestri dkk., 2019).

Kementerian Perikanan dan Kelautan Republik Indonesia pada tahun 2019 telah menerbitkan surat keputusan mengenai penggunaan obat ikan untuk pengobatan dalam kasus penyakit, sehingga antibiotik atau bahan kimia lainnya tidak digunakan secara berlebihan. Batas maksimum residu (BMR) untuk tetrasiklin berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-6366-2000 pada daging adalah 0,1 mg/kg. Menurut Orlando *and* Samionato (2013), BMR tetrasiklin pada daging ikan adalah 2 mg/kg, serta *Codex Alimentarius Commission* (2017) menentukan BMR untuk golongan tetrasiklin sebesar 0,2 mg/kg pada daging ikan.

Keberadaan residu antibiotik pada daging ikan telah banyak dilaporkan dari hasil penelitian, misalnya penelitian Nurhasnawati dkk. (2016) yang menunjukkan bahwa sampel ikan air tawar dari Pasar Segiri, Samarinda, Kalimantan Timur mengandung residu tetrasiklin. Penelitian Barani *and* Fallah (2014) yang menunjukkan bahwa 86 dari 138 sampel ikan trout di Iran terdeteksi mengandung residu tetrasiklin. Selain itu, penelitian Pawestri dkk. (2019) juga menunjukkan sebanyak 31% daging ikan nila yang tersebar di 16 pasar tradisional Kota Yogyakarta terdeteksi mengandung residu tetrasiklin yang berada di atas batas maksimum. Sehingga deteksi residu antibiotik pada budidaya ikan mas diperlukan agar pemerintah dapat meningkatkan pengawasan residu terhadap pangan.

Residu antibiotik tetrasiklin dalam bahan pangan jumlahnya sangat kecil, sehingga diperlukan suatu metode analisis yang lebih akurat, sensitif, efektif, dan efisien (Pawestri dkk., 2019). Analisis residu antibiotik tetrasiklin banyak dikembangkan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) seperti yang telah dilakukan oleh Muriurki *et al.* (2001), Pawestri dkk. (2019), dan Hakimah dkk. (2019). Metode KCKT memiliki berbagai keunggulan dalam proses pemisahan atau pemurniannya, yaitu dapat menghasilkan data analisis yang cepat dan akurat, mudah dalam proses pengoperasiannya, mengurangi limbah dari eluen, memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, dapat menggunakan

bermacam-macam detektor, memiliki resolusi yang baik, serta dapat menghindari dekomposisi sampel yang dianalisis (Ardianingsih, 2009).

Penentuan kadar residu tetrasiklin dengan KCKT perlu dilakukan optimasi dan validasi metode agar mengetahui metode yang dilakukan telah sesuai dan memberikan hasil atau data yang dapat dipercaya. Penentuan kadar residu tetrasiklin dan derivatnya dengan menggunakan KCKT pada produk perikanan di Indonesia dapat mengacu pada Standar Nasional Indonesia (SNI) 2354.11:2009 dengan menggunakan fase gerak metanol, asetonitril dan asam oksalat. Namun, penelitian lain juga telah melakukan penentuan residu tetrasiklin dengan berbagai jenis fase gerak dan komposisi yang berbeda. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan menggunakan variasi fase gerak asetonitril dan air, serta optimasi terhadap komposisi fase gerak dan laju alir untuk mendapatkan pemisahan yang lebih baik dalam kondisi optimal.

Optimasi pada sistem KCKT untuk penentuan residu tetrasiklin pada ikan mas dengan fase gerak asetonitril : air dan fase diam C18 yang telah optimal akan digunakan dalam analisis validasi metode. Validasi metode digunakan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan dalam suatu penelitian telah memenuhi persyaratan sehingga dapat dinyatakan bahwa data yang diperoleh selama penelitian merupakan hasil yang baik dan dapat dipercaya (Harmita, 2004). Hal ini sesuai dengan sistem manajemen mutu standar Indonesia 17025 (SNI-17025) tahun 2017 yang mengharuskan laboratorium pengujian dalam menganalisis bahan menggunakan metode pengukuran yang valid.

Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini akan dilakukan optimasi dan validasi metode penentuan tetrasiklin pada daging ikan mas (*Cyprinus carpio*) menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Parameter validasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah presisi, akurasi, linearitas, selektivitas, batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ) serta dilakukan juga penentuan ketidakpastian pengukuran untuk menjamin hasil analisis.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan optimasi komposisi fase gerak dan laju alir pada penentuan kadar antibiotik tetrasiklin dengan KCKT.
2. Melakukan validasi metode penentuan kadar residu antibiotik tetrasiklin menggunakan KCKT dengan parameter presisi, akurasi, linearitas, selektivitas, batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ).
3. Menghitung ketidakpastian pengukuran metode analisis kadar residu antibiotik tetrasiklin dengan KCKT.
4. Mengaplikasikan metode penentuan kadar residu antibiotik tetrasiklin pada sampel daging ikan mas menggunakan KCKT.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai optimasi KCKT dan metode analisis penentuan kadar residu antibiotik tetrasiklin dengan KCKT yang telah tervalidasi serta mengetahui kadar residu antibiotik tetrasiklin pada ikan mas yang beredar di Pasar Kota Bandar Lampung.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Ikan merupakan salah satu sumber utama protein hewani sebagai pemenuhan kebutuhan gizi dan 30% berasal dari budidaya untuk dikonsumsi manusia (Hastein *et al.*, 2006). Masyarakat Indonesia banyak yang melakukan budidaya perikanan karena ikan mengandung banyak protein, lemak serta vitamin. Salah satu budidaya ikan air tawar, misalnya ikan mas yang merupakan salah satu komoditi yang telah berkembang pesat karena memiliki rasa daging yang enak, gurih serta mengandung protein yang tinggi (Limbong dan Limbong, 2018). Ikan mas atau ikan karper yang memiliki nama latin *Cyprinus carpio* merupakan ikan air tawar yang banyak hidup di perairan Indonesia. Ikan mas yang ada di perairan Indonesia mulai dipelihara sejak tahun 1920 yang dibawa dari Cina, Eropa, Taiwan, dan Jepang. Ikan mas tergolong dalam jenis ikan omnivora yang biasanya makanan utamanya terdapat di dasar dan tepi perairan (Bramantio, 2001).

2.1.1 Klasifikasi Ikan Mas

Klasifikasi ikan mas menurut Khairuman dkk. (2008) yaitu :

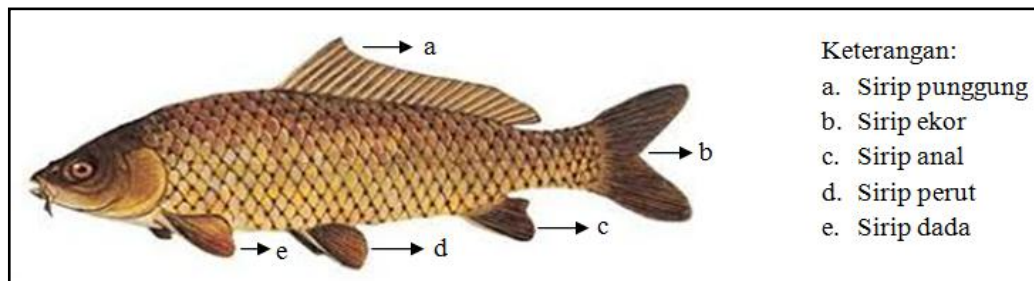
Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Kelas	: Osteichthyes
Sub Kelas	: Actinopterygi
Ordo	: Cyprinoformes
Sub Ordo	: Cyprinoidea
Famili	: Cyprinidae
Sub Famili	: Cyprininae

Genus : *Cyprinus*
 Spesies : *Cyprinus carpio*

2.1.2 Morfologi dan Jenis-Jenis Ikan Mas

Menurut Susanto (2014), ikan mas terdiri dari beberapa bagian morfologi dan secara umum dapat dilihat pada Gambar 1.

- Bentuk tubuh memanjang dan sedikit pipih.
- Terdapat sisik pada sebagian besar tubuh ikan mas.
- Mulutnya terletak di ujung tengah (terminal) sebagai protektil dan terdapat dua pasang sungut yang tidak bergerigi.
- Gigi kerongkongan terdiri atas tiga baris berbentuk geraham.
- Sirip ikan mas bagian punggung (dorsal) berbentuk memanjang dengan berjari-jari keras dan di ujungnya bergerigi, sedangkan pada sirip bagian dubur (anal) juga berjari-jari keras dan bergerigi di ujungnya.
- Sirip ekor seperti cagak memanjang yang simetris sampai ke belakang.
- Pada bagian tengah tubuh ikan mas terdapat garis rusuk atau gurat sisi yang lengkap dengan posisi melintang dari tutup insang sampai pangkal ekor.



Gambar 1. Morfologi ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Thomas, 2000)

Jenis-jenis ikan mas dapat dibagi menjadi 2 berdasarkan fungsinya, yaitu sebagai ikan konsumsi dan ikan hias. Jenis ikan mas untuk konsumsi, misalnya ikan mas Punten, ikan mas Sinyonya, ikan mas Taiwan, ikan mas Merah, ikan mas Majalaya, ikan mas Yamato, dan ikan mas lokal, sedangkan jenis ikan mas sebagai ikan hias, misalnya ikan mas Kumpray, ikan mas Kancra Domas, ikan mas Fancy, dan ikan mas Koi (Khairuman dkk., 2008). Jenis ikan mas yang sering

ditemui di pasaran untuk dikonsumsi adalah ikan mas Majalaya dan Sinyonya, di mana kedua jenis tersebut memiliki kriteria yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kriteria ikan mas Majalaya dan Sinyonya

Kriteria	Majalaya		Sinyonya	
	Jantan	Betina	Jantan	Betina
Umur pertama matang kelamin (bulan)	8	18	8	18
Panjang standar (cm)	22	35	24	36
Berat tubuh pertama matang gonad (gram/ekor)	500	2.500	500	2.000
Fekunditas (butir/kg)(10 ³)	-	85 - 125	-	85 - 125
Diameter telur (mm)	-	0,9 - 1,1	-	0,9 - 1,1
Panjang : tinggi badan	2,3 : 1	2,3 : 1	3,30 : 1	3,30 : 1
Panjang standar : panjang kepala	3,57 : 1	3,57 : 1	3,60 : 1	3,60 : 1
Jumlah sisik gurat sisi	26 - 33	26 - 33	32 - 36	32 - 36

Sumber: SNI 01-6130-1999 dan SNI 01-6134-1999

2.1.3 Habitat Ikan Mas

Ikan mas umumnya menyukai habitat dengan aliran tenang dengan kedalaman ± 1 meter. Jika dalam bentuk larva ikan mas maka lebih menyukai perairan yang tenang, dangkal, dan terbuka, sedangkan benih ikan mas yang berukuran cukup besar akan lebih menyukai perairan yang dalam dan mengalir. Di alam bebas, ikan mas banyak ditemukan pada bagian-bagian sungai yang terlindungi oleh pohon-pohon. Ikan mas dapat hidup di daerah pada ketinggian 150 - 600 mdpl dan pada suhu 25 - 30°C. Beberapa ikan mas juga dapat ditemukan di perairan muara bersalinitas 20-30% atau di air payau (Khairuman dkk., 2008; Narantaka, 2012). Kisaran pH untuk ikan mas yang cocok yaitu 6 – 9 serta oksigen terlarut atau *dissolved oxygen* (DO) yang optimal dalam kelangsungan hidup ikan mas berkisar antara 3,40 – 5,19 mg/L (Rudiyanti dan Ekasari, 2009).

2.1.4 Penyakit Pada Ikan Mas

Penyakit pada ikan termasuk salah satu hambatan dalam proses budidaya ikan. Penyakit pada ikan dapat diartikan sebagai sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada fungsi alat tubuh baik secara langsung maupun tidak langsung. Serangan penyakit pada ikan terdiri dari penyakit infeksi dan non infeksi. Penyakit infeksi misalnya seperti terkena serangan patogen dari bakteri, virus maupun jamur, sedangkan penyakit non infeksi misalnya suatu penyakit yang disebabkan oleh pengaruh lingkungan, genetik, maupun pakan (Rahmawati dkk., 2021).

Beberapa jenis penanggulangan yang dapat digunakan untuk menyembuhkan penyakit pada ikan mas yaitu antibiotik kloramfenikol dan tetrasiklin dapat menyerang bakteri *Aeromonas hydrophila* (Mariyono dan Sundana, 2002), serangan bakteri *Pseudomonas fluorescens* atau *Pseudomonas* sp. yang dapat dikendalikan dengan antibiotik tetrasiklin (Prihatman, 2000; Supriyadi dkk., 2003), serangan virus Koi Herpes Virus (KHV) yang dikendalikan dengan efikasi vaksin KV3 (Kovax) dan ekstrak daun mangrove (Mulyani dkk., 2013), penyakit gatal atau trichodiniasis oleh parasit *Trichodina* sp. dapat diatasi dengan merendam ikan pada larutan formalin 15 menit (Irianto, 2005), dan kutu ikan atau argulosis dengan cara direndam pada larutan garam (Prihatman, 2000).

2.2 Antibiotik

Penemuan antibiotik dilakukan pertama kali oleh Alexander Fleming pada 1928 secara tidak disengaja, di mana antibiotik alami pertamanya yaitu Penicillin. Antibiotik merupakan suatu golongan senyawa alami maupun sintesis yang memiliki efek menghentikan atau menekan proses biokimia pada mikro organisme, terutama pada proses infeksi oleh bakteri, tetapi tidak efektif melawan virus (Kemenkes RI, 2011). Antibiotik dapat dihasilkan dari jamur, aktinomisetes maupun dari jasad renik bakteri. Berdasarkan sumber perolehannya, antibiotik dibedakan menjadi 3, yaitu antibiotika alami yang diperoleh secara alami,

antibiotika sintetis yang disintesis dalam laboratorium, dan antibiotika semisintetis yang dimodifikasi dengan penambahan senyawa kimia di laboratorium (Katzung, 2010).

Antibiotik dapat digunakan untuk mengobati dan mencegah penyakit menular pada manusia dan hewan, untuk meningkatkan laju pertumbuhan dan efisiensi pada pakan hewan, serta digunakan dalam pertanian dan akuakultur (Cabello, 2006). Penggunaan antibiotik dapat mengurangi tingkat kematian yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Konsumsi antibiotik berkisar antara 100.000 dan 200.000 ton per tahun, di mana sekitar 50% digunakan dalam kedokteran (Van Boeckel *et al.*, 2014) dan selama beberapa dekade terakhir, antibiotik semakin banyak digunakan dalam pertanian, perikanan dan produksi hewan sebagai pemicu pertumbuhan hewan serta tumbuhan (Saniwanti dkk., 2015). Jenis antibiotik yang akan digunakan bergantung pada infeksi bakteri yang menyebabkannya. Menurut Utami (2012), penyebab utama resistensi antibiotik adalah penggunaannya yang meluas dan irasional (tidak tepat).

Pada dasarnya antibiotik dapat dimanfaatkan untuk mengatasi berbagai macam penyakit dalam industri farmasi rumah sakit, namun saat ini antibiotik digunakan secara luas dalam pembibitan ternak dan budidaya ikan. Penggunaan antibiotik tersebut dapat membunuh mikroorganisme sehingga dapat menjaga kesehatan dan perkembangan ikan secara optimal. Namun, penggunaan antibiotik sebagai zat aditif untuk pemicu pertumbuhan saat ini telah dilarang karena bisa menyebabkan resistensi. Secara umum diketahui bahwa 20-30% antibiotik berada dalam tubuh ikan dan 70-80% ditularkan ke lingkungan (Sanjayadi dan Violita, 2020). Jika antibiotik dibuang sembarangan ke medium maka menimbulkan bahaya besar bagi habitat dan semua makhluk hidup (Zhong *et al.*, 2018; Uma and Rebecca, 2018). Dengan meluasnya penggunaan antibiotik dapat menyebabkan timbulnya berbagai permasalahan lingkungan perairan karena memiliki efek samping bersifat toksisitas kuat dan menyebabkan terganggunya pertumbuhan organisme dan mikroba perairan (Lou *et al.*, 2016).

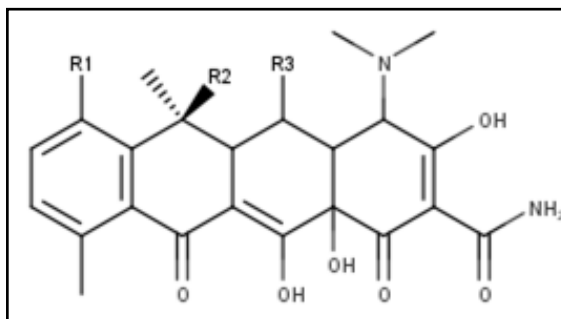
Penggunaan antibiotik pada budidaya ikan dan hewan darat memiliki sedikit perbedaan dari segi penggunaannya. Pada budidaya ikan, antibiotik secara teratur ditambahkan pada pakan ikan ataupun langsung ditambahkan ke dalam air. Penggunaan antibiotik dalam budidaya perikanan juga melibatkan aplikasi lingkungan yang luas dan mempengaruhi berbagai pola kehidupan bakteri (Romero *et al.*, 2012). Antibiotik juga dapat digunakan untuk tujuan nonterapi yaitu sebagai pemacu pertumbuhan ikan dengan cara menambahkan antibiotik dengan pakan buatan. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat berpotensi menyebabkan adanya residu antibiotik dalam jaringan organ hewan ternak (Yuningsih, 2004).

2.2.1 Antibiotik Tetrasiklin

Golongan antibiotik yang umum digunakan berdasarkan bentuk strukturnya yaitu amoksilin, ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, kuinolon, makrolida, dan sulfonamid. Residu antibiotik yang sering ditemukan pada budidaya perikanan adalah antibiotik terasiklin (Hakimah dkk., 2019). Tetrasiklin memiliki rumus molekul $C_{22}H_{24}N_2O_8$ dengan berat molekul 444,435 g/mol. Tetrasiklin merupakan kelompok antibiotik yang diproduksi oleh jamur *S. aureofaciens* atau *S. rimosus*, di mana antibiotik ini bersifat bakteriostatik dengan daya jangkauan (spektrum) luas serta sebagai inhibitor yang mengganggu sintesis protein dengan cara mengikat sub unit 30S pada ribosom sel bakteri. Karena memiliki spektrum luas, maka tetrasiklin dapat digunakan dalam melawan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Tetrasiklin sangat sukar larut dalam air dan etanol, namun mudah larut dalam asam encer maupun alkali hidroksida. Tetrasiklin berbentuk serbuk hablur, berwarna kuning, tidak berbau dan agak higroskopis. Antibiotik ini bersifat stabil di udara tetapi pada pemaparan terhadap cahaya matahari yang kuat dalam udara lembab akan menjadi gelap. Tetrasiklin dapat membentuk garam dengan ion Na^+ dan Cl^- sehingga kelarutannya menjadi lebih baik (Pawestri dkk., 2019). Suatu kelompok tetrasiklin terdiri dari oksitetrasiklin, dioksitetrasiklin, tetrasiklin dan

klortetrasiklin. Dalam strukturnya, tetrasiklin mempunyai gugus kromofor (ikatan rangkap terkonjugasi) dan gugus auksokrom (gugus hidroksil, amida, dan amina). Struktur tetrasiklin dan derivatnya dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 2.



Gambar 2. Struktur kelompok tetrasiklin (Orlando *and* Simionato, 2013)

Tabel 2. Keterangan komponen R₁, R₂ dan R₃ pada Gambar 2

Komponen		R ₁	R ₂	R ₃
Tetrasiklin	(TC)	H	OH	H
Oksitetrasiklin	(OTC)	H	OH	OH
Klortetrasiklin	(CTC)	Cl	OH	H
Dioksitetrasiklin	(DC)	H	H	OH

Pada unggas, tetrasiklin digunakan untuk mengatasi infeksi CRD (*Chronic Respiratory Diseases*), *erisipelas* dan sinusitis (Subroto dan Tjahjati, 2001), sedangkan pada budidaya perairan tetrasiklin banyak digunakan sebagai terapi, pencegahan dan peningkatan laju pertumbuhan (Yuningsih, 2004). Golongan tetrasiklin tidak termasuk dalam daftar zat aditif pakan yang diizinkan di Indonesia (Etikaningrum dan Iwanto, 2017). Merk dagang tetrasiklin di pasaran misalnya, *Tetracycline HCl*, *Bufacyn*, *Novacycline*, *Itracycline*, *Oxytetracycline*, *Terikotin*, *Oxybiotic*, *Terramycin*, *Viadoxin*, dan lain-lain.

Batas maksimum residu (BMR) untuk tetrasiklin yang ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-6366-2000, pada daging adalah 0,1 mg/kg. Menurut Orlando *and* Samionato (2013), BMR tetrasiklin pada daging ikan adalah 2 mg/kg, sedangkan *Codex Alimentarius Commission* (2017) menentukan BMR untuk golongan tetrasiklin sebesar 0,2 mg/kg pada daging ikan.

2.2.2 Dampak Residu Antibiotik

Keberadaan residu obat-obatan dalam makanan dapat mempengaruhi kesehatan manusia, misalnya terjadinya keracunan, resistensi mikroba dan gangguan fisiologis pada manusia. Bahaya dari penggunaan antibiotik dalam produksi akuakultur terhadap kesehatan masyarakat dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Lupin, 2009)

- a) Bahaya yang disebabkan oleh residu antibiotik yang masih diperbolehkan pada ikan dan produk ikan. Hal ini dapat diartikan bahwa penggunaan antibiotik sebenarnya masih berada dalam batas yang diperbolehkan. Namun, dalam aplikasinya melewati batas yang dianjurkan sehingga berpotensi terhadap bahaya resistensi.
- b) Bahaya yang disebabkan oleh residu antibiotik yang dilarang, yaitu penggunaan antibiotik yang memang dilarang namun tetap digunakan. Hal ini biasanya terjadi karena kurangnya pengawasan atas peredaran obat-obatan yang dilarang serta kurangnya pemahaman pengguna atas bahaya yang ditimbulkan apabila tetap mempergunakan jenis antibiotik yang dilarang tersebut.
- c) Bahaya yang disebabkan oleh perkembangan resistensi terhadap antibiotik pada mikroba patogen di lingkungan yang disebabkan oleh penggunaan antibiotik.

Penggunaan antibiotik pada industri budidaya perikanan menyebabkan terjadinya resistensi saat dikonsumsi manusia. Jika ikan menjadi inang penyakit yang sudah resisten terhadap suatu antibiotik, maka dapat terjadi transfer resistensi pada bakteri lainnya di wilayah yang berbeda. Bahkan bisa terjadi transfer resistensi pada patogen yang menyerang manusia. Hal tersebut telah dibuktikan dalam penelitian yang dilakukan dengan uji coba transfer horizontal plasmid bakteri penentu resistensi dari patogen ikan ke bakteri patogen pada manusia termasuk bakteri *Escherichia coli* (Grigorakis and Rigos, 2011).

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau dikenal juga dengan nama Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu proses pemisahan senyawa yang berdasarkan kepolarannya, terdiri dari kolom sebagai fase diam dan larutan tertentu sebagai fase gerak, serta menggunakan tekanan tinggi untuk dapat mendorong fase gerak. Fase diam dan fase gerak harus memiliki tingkat kepolaran yang berbeda agar proses pemisahan dapat berlangsung. Sampel dibawa oleh fase gerak (*mobile phase*) melewati kolom. Kolom berisi fase diam (*stationery phase*) yang berupa cairan dan berfungsi memisahkan komponen sampel. Senyawa kimia yang memiliki bobot molekul rendah maupun tinggi, umumnya dapat dipisahkan komponen-komponennya dengan metode kromatografi.

Instrumen kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) memiliki peran yang penting dalam analisis di laboratorium. KCKT dapat digunakan dalam analisis secara kualitatif maupun kuantitatif, misalnya dalam pengukuran kandungan senyawa bioaktif dalam ekstrak tumbuhan dan penentuan kadar antibiotik. Selain itu, instrumen KCKT juga dapat digunakan dalam pemisahan atau pemurnian senyawa dari senyawa lainnya. Dalam menentukan kadar secara kualitatif maupun kuantitatif dapat menggunakan larutan standar sebagai larutan pembanding, yaitu dengan cara eksternal (menyuntikkan sampel dan standar secara terpisah) dan dengan cara internal (menyuntikkan sampel dan standar secara bersamaan) (Murningsih dan Chairul, 2000). Instrumen KCKT dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Seperangkat alat KCKT

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur secara keseluruhan, berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas seluruh pelarut yang digunakan, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar dari fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sedangkan untuk fase terbalik (fase diam kurang polar dari fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Syarat fase gerak yaitu memiliki kemurnian tinggi, *inert*, sesuai dengan detektor, dan mudah didapat.

Pemilihan fase gerak dapat ditentukan berdasarkan indeks polaritas (P') dari campuran fase gerak yang akan digunakan. Semakin besar nilai indeks kepolaran atau polaritas (P') maka akan semakin polar fase gerak tersebut. Fase gerak yang umum digunakan merupakan campuran dari dua atau lebih pelarut yang di mana akan menghasilkan nilai indeks polaritas sendiri yang disebut indeks polaritas fase gerak (Harvey, 2000). Tabel 3 menunjukkan indeks polaritas beberapa pelarut pada KCKT.

Tabel 3. Indeks polaritas dan karakteristik beberapa pelarut KCKT

Pelarut	Keasaman (α)	Kebasaan (β)	Dipolaritas (π)	Indeks polaritas (P')
Asam asetat	0,54	0,15	0,31	6,0
Asetonitril	0,15	0,25	0,60	5,8
Alkana	0,00	0,00	0,00	0,1
Kloroform	0,43	0,00	0,57	4,1
Dimetilsulfoksida	0,00	0,43	0,57	7,2
Etanol	0,39	0,46	0,25	4,3
Metanol	0,43	0,29	0,29	5,1
Nitrometana	0,17	0,19	0,64	6,0
Propanol	0,36	0,40	0,24	3,9
Tetrahidrofuran	0,00	0,49	0,51	4,0
Trietilamin	0,00	0,84	0,16	1,9
Air	0,43	0,18	0,39	10,2

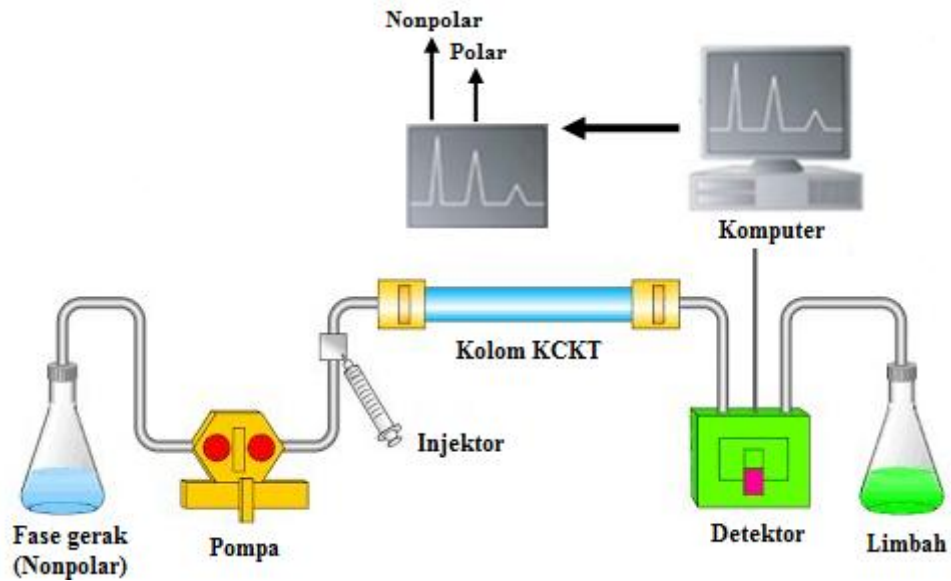
Sumber : Snyder *et al.* (2010)

Setiap campuran yang keluar dari kolom akan terdeteksi pada detektor dan direkam dengan bentuk kromatogram. Di mana jumlah *peak* (puncak) menyatakan jumlah komponen dan luas *peak* menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran (Hendayana, 2006). KCKT memiliki berbagai keunggulan dalam proses pemisahan atau pemurniannya, yaitu dapat menghasilkan data analisis yang cepat dan akurat, mudah dalam proses pengoperasiannya, mengurangi limbah dari eluen, memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, dapat menggunakan bermacam-macam detektor, memiliki resolusi yang baik, serta dapat menghindari dekomposisi sampel yang dianalisis (Ardianingsih, 2009).

Jenis-jenis kromatografi pada KCKT berdasarkan fase diam dan gerakannya, yaitu:

a. Kromatografi fase normal (*normal-phase chromatography*)

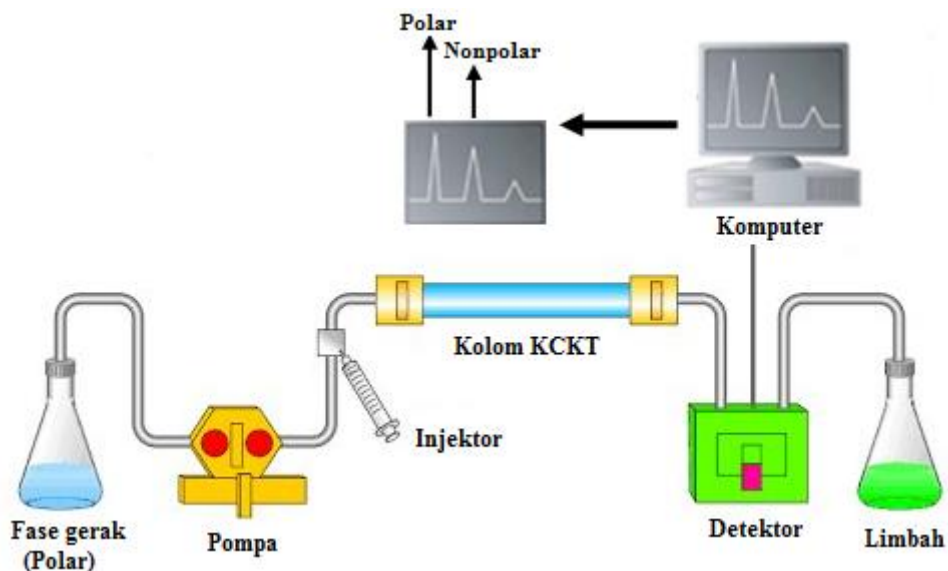
Pada kromatografi fase normal digunakan fase diam polar dan menggunakan fase gerak nonpolar (Gambar 4). Fase diam biasanya adalah silika gel, sedangkan fase gerakannya yaitu diklorometan, kloroform, dietil eter, heksana, dan lain-lain. Dalam fase ini yang akan keluar terlebih dahulu adalah senyawa yang paling nonpolar.



Gambar 4. Kromatografi fase normal (Biomall, 2009)

b. Kromatografi fase terbalik (*reverse-phase chromatography*)

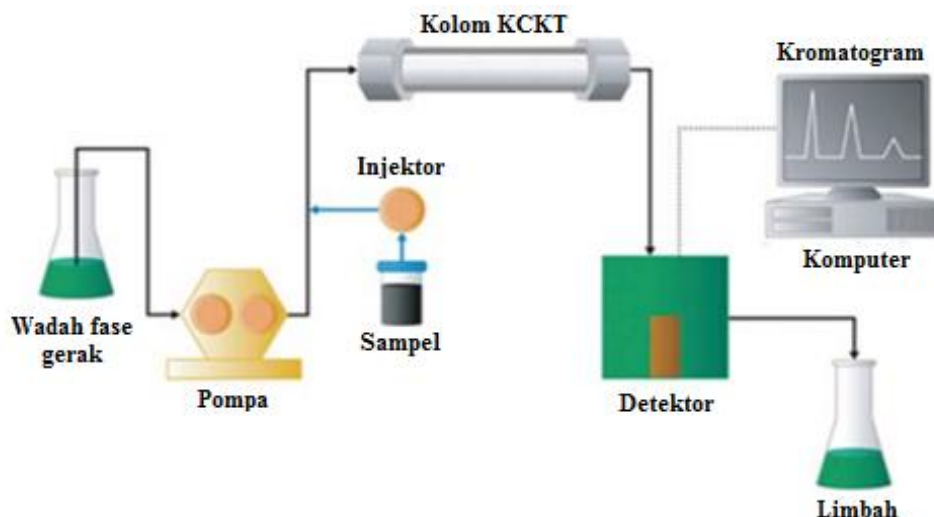
Pada kromatografi fase terbalik digunakan fase diam nonpolar dan menggunakan fase gerak polar (Gambar 5). Fase diamnya adalah ODS/C18 (oktadesilsilan) atau C8 (oktilsilan), sedangkan fase geraknya yaitu air, metanol, asetonitril, THF, dan lain-lain. Dalam fase ini yang akan keluar terlebih dahulu adalah senyawa yang paling polar.



Gambar 5. Kromatografi fase terbalik (Biomall, 2009)

2.3.1 Instrumentasi KCKT

Instrumen KCKT secara umum terdiri dari beberapa rangkaian alat wadah pelarut, pompa, injektor, kolom, dan detektor yang masing-masing memiliki fungsi berbeda. Namun, jika semuanya berjalan dengan baik maka akan memberikan data yang akurat serta dapat digunakan untuk analisis kuantitatif maupun analisis kualitatif. Sistem KCKT dapat diilustrasikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Sistem kromatografi cair kinerja tinggi (Anastasia, 2011)

a. Wadah Pelarut (*Solvent Reservoir*)

Wadah pelarut atau fase gerak harus bersih dan *inert*. Wadah pelarut yang kosong atau labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak yang digunakan harus dilakukan penyaringan terlebih dahulu untuk menghindari adanya partikel kecil yang tidak diinginkan.

b. Pompa

Pompa merupakan alat yang digunakan untuk mendorong fase gerak menuju kolom. Pompa terbuat dari bahan gelas, baja tahan karat, teflon atau batu nilam, di mana pompa harus bersifat *inert* terhadap fase gerak, memberikan tekanan yang tinggi serta mampu memberikan aliran sistem isokratik maupun gradien. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3

mL/menit. Terdapat 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu, pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan.

c. Tempat injeksi sampel (Injektor)

Injektor adalah alat untuk memasukkan sampel ke dalam kolom yang dapat dilakukan secara otomatis (*auto injector*) ataupun manual (*manual injector*). Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal.

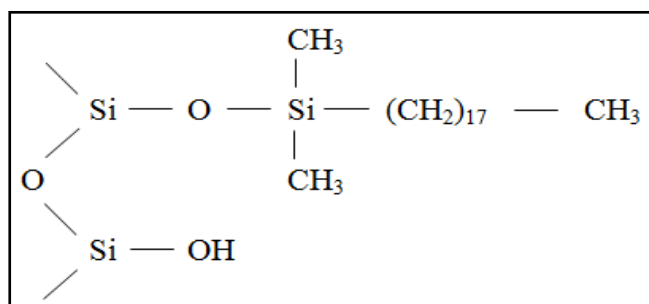
d. Kolom

Kolom merupakan bagian terpenting dalam pemisahan yang terbuat dari logam, kaca dan *stainless* berbentuk tabung yang dapat menahan tekanan tinggi. Pemisahan senyawa sangat bergantung pada kolom. Kolom atau fase diam adalah tempat terjadinya pemisahan komponen-komponen campuran karena adanya perbedaan kekuatan interaksi antara zat-zat terlarut terhadap fase gerak. Zat-zat yang lebih kuat interaksinya dengan fase gerak akan keluar lebih dahulu. Semakin lemah interaksi analit dengan fase diam, semakin cepat analit tersebut keluar kolom.

Proses pemisahan pada kolom yaitu memisahkan komponen-komponen dalam sampel. Syarat fase diam adalah bersifat *inert*, tidak larut dalam fase gerak, tidak berwarna, memberikan aliran yang baik terhadap fase gerak, tahan tekanan tinggi, memiliki gugus fungsi aktif, stabil dan tidak mudah rusak (Susanti dan Dachriyanus, 2010). Fase diam yang sering digunakan adalah Oktadesil silika (ODS atau C18) karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi.

Kolom C18 adalah kolom silika gel termodifikasi, di mana pada gugus silanolnya (Si-OH) terikat hidrokarbon dengan 18 gugus karbon yang membuat kolom ini lebih nonpolar. Selain ODS, terdapat juga kolom BDS

(*Base Deactivated Silica*) yang dapat digunakan dalam pemisahan dengan KCKT. Perbedaan antara kolom ODS dan BDS yaitu kolom ODS memiliki gugus fungsi -OH yang bebas, sedangkan kolom BDS memiliki gugus -OH yang dinonaktifkan. Kolom ODS juga memiliki *tailing* puncak yang tinggi, sedangkan kolom BDS dirancang untuk mengurangi *tailing* puncak. Kolom C18 memiliki jumlah atom karbon yang banyak sehingga bersifat hidrofobik dan mampu menahan komponen nonpolar lebih lama. Struktur kolom C18 ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur kolom C18

e. Detektor

Detektor merupakan suatu alat yang mendeteksi komponen-komponen senyawa kimia yang telah terpisah melewati kolom. Sinyal yang terdeteksi akan diplot terhadap waktu oleh komputer yang disebut kromatogram. Kromatogram menampilkan puncak-puncak yang memiliki karakteristik berbeda karena adanya senyawa yang berbeda. Syarat kromatogram yang baik adalah memiliki bentuk puncak yang simetri, waktu retensi < 10 menit, dan resolusi $\geq 1,5$ (Rosydiati dan Saleh, 2019).

Pemilihan detektor diperlukan agar mendapatkan detektor yang sensitif untuk pemisahan atau senyawa. Detektor harus memenuhi syarat untuk dapat digunakan analisis, yaitu memiliki sensitivitas tinggi, gangguan rendah, daerah respon linear yang luas, stabil dan tidak peka terhadap perubahan laju alir maupun suhu. Beberapa jenis detektor yang dapat digunakan dalam KCKT yaitu *photo-diode array* (PDA), detektor *refractive index*, *bulk*

property detector, detektor UV-Vis, *solute property detector*, detektor fluorescence, dan detektor elektro-kimia.

Detektor *photo-diode array* (PDA) merupakan detektor UV dengan beberapa keistimewaan seperti memiliki kecepatan deteksi 300-400 kali lebih baik dari detektor *Photomultiplier Tube* (PMT), rentang pengukuran panjang gelombangnya 200-650 nm, tidak mengalami pergerakan mekanis, dan hanya terdapat satu lensa fokus. Pada detektor PDA juga mampu menampilkan kromatogram tiga dimensi yang akan sangat membantu dalam menentukan kemurnian puncak kromatogram (Susanti dan Dachriyanus, 2010).

2.3.2 Parameter KCKT

Parameter yang biasa digunakan dalam metode KCKT yaitu:

a. Waktu retensi (t_R)

Waktu retensi atau *retention time* adalah selang waktu yang diperlukan solut (zat terlarut) saat mulai diinjeksikan (*running*) sampai keluar dari fase diam atau kolom dan sinyal kromatogram direkam oleh detektor. Waktu retensi pelarut (zat yang tidak teretensi) disebut *dead-time* yang disimbolkan t_0 atau t_m . Pengukuran waktu retensi tidak dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu komponen, karena waktu retensi ditentukan oleh susunan dan cara kerja kolom, sehingga waktu retensi adalah karakteristik terhadap suatu komponen, namun tidak spesifik. Syarat waktu retensi yang baik yaitu ≤ 10 menit (Depkes RI, 1995).

b. Faktor retensi atau faktor kapasitas (k')

Faktor retensi atau faktor kapasitas adalah pengukuran retensi suatu senyawa pada kondisi tertentu. Kondisi yang dimaksud yaitu pada komposisi fase gerak, suhu dan jenis kolom tertentu. Hubungan antara waktu retensi dan faktor retensi dapat dilihat pada Persamaan 1, yaitu semakin besar nilai t_r maka semakin besar juga nilai k' . Nilai k' yang disarankan yaitu $2 \leq k' \leq 10$ menit (Snyder *et al.*, 2010). Faktor retensi dapat dihitung dengan Persamaan 2, di

mana V_r adalah retensi volume analit (mL), V_0 adalah retensi volume fase gerak (mL), t_R adalah waktu retensi dalam menit, dan t_0 adalah waktu retensi analit yang tidak tertahan dalam menit.

$$t_R = t_0 (1 + k') \quad (1)$$

$$k' = \frac{V_r - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

Jika nilai k' terlalu kecil, maka kolom menahan analit sedikit dan analit terelusi dekat dengan puncak fase gerak sehingga pemisahan kurang bagus. Sedangkan jika nilai k' terlalu besar, maka menunjukkan pemisahan yang baik, namun waktu analisis terlalu lama.

c. Faktor selektivitas (α)

Faktor selektivitas menggambarkan posisi relatif dua puncak komponen yang berdekatan yakni perbandingan waktu retensi komponen B dengan waktu retensi komponen A. Nilai faktor selektivitas (α) dapat dihitung dengan Persamaan 3.

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t'_{RB}}{t'_{RA}} = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0} \quad (3)$$

Jika nilai $\alpha > 1$, maka akan terjadi pemisahan pada komponen A dan komponen B. Semakin tinggi nilai α , maka semakin baik pemisahan komponen.

d. Efisiensi Kolom

Efisiensi kolom merupakan suatu karakteristik yang penting dalam kolom yang menyatakan ukuran kemampuan kolom untuk dapat memisahkan senyawa campuran. Pengukuran terhadap efisiensi kolom membutuhkan faktor lebar puncak (W) karena waktu retensi akan berpengaruh terhadapnya. Jika nilai W bertambah, maka t_R juga meningkat. Terdapat 2 cara untuk menentukan efisiensi kolom yaitu dengan jumlah plat teoritis (N) dan jarak setara plat teoritis (HETP).

1) Jumlah plat teoritis atau *plate number* (N)

Jumlah plat teoritis (N) menunjukkan banyaknya distribusi dinamis yang terjadi pada kolom dan digunakan untuk mengetahui efisiensi kolom.

Jumlah minimal plat teoritis yang akan menghasilkan pemisahan yang baik berjumlah 2000 plat. Semakin tinggi nilai N , maka efisiensi kolom semakin baik. Jumlah lempeng (plat) teoritis dapat dihitung dengan Persamaan 4, di mana t_R adalah waktu retensi dan W adalah lebar puncak pada posisi *baseline*.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4)$$

2) Tinggi plat atau *plate height* (H)

Parameter lain terkait efisiensi kolom yaitu tinggi plat (*plate height*) yang disimbolkan H dengan satuan unit panjang. Tinggi plate (H) atau disebut juga dengan *High Equivalent of Theoretical Plate* (HETP) merupakan panjang kolom kromatografi (dalam mm) yang diperlukan hingga terjadi satu kali kesetimbangan molekul analit dalam fase gerak dan fase diam. HETP berbanding terbalik dengan jumlah plat teoritis (N). Semakin kecil nilai HETP, maka semakin efisien suatu pemisahan. Kolom untuk KCKT umumnya memiliki tinggi plat antara 0,01 – 1 mm. Tinggi plat juga dapat dirumuskan dengan Persamaan 5, di mana L adalah panjang kolom.

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

e. Derajat keterpisahan atau resolusi (R_s)

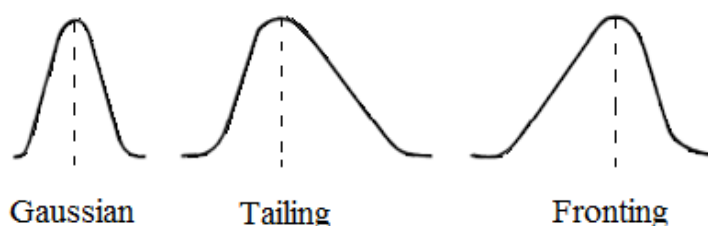
Derajat keterpisahan atau resolusi merupakan perbedaan antara waktu retensi 2 puncak berdekatan dibagi dengan lebar rata-rata kedua puncak. Nilai R_s dapat dihitung dengan Persamaan 6.

$$R_s = 2 \frac{t_{RB} - t_{RA}}{W_A + W_B} \quad (6)$$

Jika nilai $R_s \geq 1,5$ maka kedua puncak akan terpisah sempurna. Jika nilai resolusi di bawah 1,25 maka akan terjadi *overlapping*. Nilai resolusi dapat ditingkatkan dengan cara menggunakan kolom yang lebih panjang untuk menambah jumlah plat teoritis.

f. Faktor asimetri atau *tailing factor* (TF)

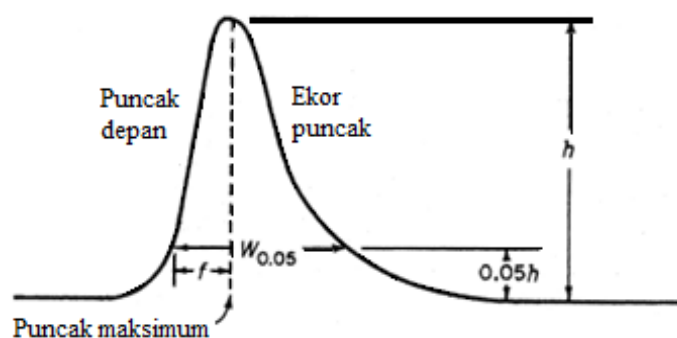
Tailing factor adalah suatu ukuran yang menyatakan bentuk puncak. Puncak yang memiliki $TF = 1$ berarti berbentuk simetris sempurna (Gaussian). Nilai $TF > 1$ menunjukkan puncak mengalami pengekoran (*tailing*) dan nilai $TF < 1$ menunjukkan puncak mengalami *fronting*. Sedangkan menurut *Center for Drug Evaluation and Research* (1994), nilai *tailing factor* yang baik yaitu ≤ 2 . Jika nilai $TF > 2$ maka harus dilakukan optimasi sistem KCKT hingga menghasilkan $TF < 2$ karena akan berpengaruh pada pemisahan. Gambar 8 menunjukkan beberapa bentuk puncak pada KCKT.



Gambar 8. Bentuk puncak yang mungkin terjadi pada KCKT (Meyer, 2010)

Tailing factor dapat dihitung dengan Persamaan 7, di mana f adalah setengah lebar puncak sebelah kiri dan $W_{0,05}$ adalah lebar alas puncak (Gambar 9). Nilai keduanya diukur pada 5% tinggi puncak dari alas puncak (Hansen *et al.*, 2012).

$$TF = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (7)$$



Gambar 9. Perhitungan TF suatu puncak kromatogram (Hansen *et al.*, 2012)

2.3.3 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif KCKT

Analisis untuk mengetahui kadar suatu antibiotik menggunakan KCKT telah banyak dikembangkan pada berbagai sampel terutama pada bahan pangan. Metode KCKT dipilih agar hasil analisis yang diperoleh lebih akurat dan efektif. Penelitian mengenai analisis residu antibiotik tetrasiklin dengan KCKT telah banyak dikembangkan, misalnya pada sampel daging ayam (Anastasia, 2011), daging ikan (Liu *et al.*, 2013; Pawestri dkk., 2019), susu (Agadellis *et al.*, 2020), madu (Rao *et al.*, 2015), telur dan udang (Liu *et al.*, 2013), serta pada bahan pangan lainnya. Penentuan kadar residu antibiotik lainnya juga dapat menggunakan metode KCKT, misalnya antibiotik sulfonamid (Li *et al.*, 2018) dan kloramfenikol (Mamani *et al.*, 2009; Saputra dan Arfi, 2020).

Analisis kualitatif adalah suatu proses analisis yang bertujuan untuk mengetahui atau mengidentifikasi ion, unsur, atau senyawa kimia baik organik maupun anorganik dalam suatu sampel. Dalam KCKT, analisis secara kualitatif dapat dilakukan dengan memperhatikan waktu retensi yang dihasilkan, yaitu membandingkan waktu retensi larutan sampel dengan larutan standar dalam metode analisis yang sama. Jika sampel menghasilkan puncak pada waktu retensi (t_R) yang berbeda dengan standar dalam analisis yang sama, maka dapat diasumsikan senyawa yang diinginkan tidak ada dalam sampel atau mungkin kadar senyawa berada di bawah limit deteksi (Susanti dan Dachriyanus, 2010).

Analisis kuantitatif adalah suatu proses analisis yang bertujuan untuk menentukan jumlah atau kadar suatu unsur atau senyawa dalam sampel. Analisis kuantitatif dalam KCKT dilakukan dengan memperhatikan perbandingan antara luas area atau tinggi puncak antara sampel dan standar dengan metode analisis yang sama. Pada penentuan kadar atau konsentrasi analit dapat menggunakan data luas puncak atau tinggi puncak. Terdapat 5 metode dalam analisis kuantitatif, yaitu metode standar eksternal, metode standar internal, metode kurva kalibrasi, metode penambahan baku, dan normalisasi area (Susanti dan Dachriyanus, 2010).

a. Metode standar eksternal

Metode ini membutuhkan standar eksternal yang dilakukan kromatografi dengan terpisah dari sampel dan kondisi analisis harus konstan. Standar eksternal yang digunakan yaitu zat yang dianggap sebagai komponen sampel yang akan diuji. Konsentrasi analit dihitung berdasarkan perbandingan area sampel dengan area baku yang sudah diketahui konsentrasinya. Pada eksternal standar digunakan suatu deret standar untuk menentukan target dalam suatu sampel, di mana standar yang digunakan hanya berjumlah 1. Deret standar yang digunakan harus memenuhi hukum Lambert-Beer. Metode eksternal standar dapat dihitung dengan Persamaan 8, di mana X adalah konsentrasi.

$$X_{\text{sampel}} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times X_{\text{standar}} \quad (8)$$

b. Kurva kalibrasi

Analisis kuantitatif dengan kurva kalibrasi dilakukan dengan menggunakan beberapa standar. Kurva kalibrasi harus memberikan garis yang lurus. Untuk menggunakan kurva kalibrasi, standar dapat diinjeksikan dengan konsentrasi paling tinggi ke konsentrasi paling rendah untuk menghindari kejenuhan pada detektor ketika membaca *peak*. Namun, dapat juga diinjeksikan dari konsentrasi paling kecil ke paling tinggi jika konsentrasi yang digunakan kecil. Penentuan kadar atau konsentrasi analit dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linear $y = bx + a$.

c. Internal standar

Analisis kuantitatif ini dilakukan dengan menggunakan larutan internal standar untuk dapat menentukan kadar target dalam suatu sampel. Pada internal standar harus memiliki respon yang mirip dengan senyawa target terhadap detektor. Analisis ini membandingkan interaksi internal standar terhadap sampel dengan interaksi internal standar terhadap standar. Analisis dengan internal standar memiliki kelebihan dapat melihat kesalahan volume injeksi, namun rumit dalam pelaksanaannya. Konsentrasi sampel dengan internal standar dapat diketahui dengan Persamaan 9 dan Persamaan 10, di mana X adalah konsentrasi dan Y adalah luas area puncak.

$$X_{\text{sampel}} = \frac{\text{Luas area sampel} / \text{Luas area ISTD}}{\text{Luas area standar} / \text{Luas area ISTD}} \times X_{\text{standar}} \quad (9)$$

$$X_{\text{sampel}} = \frac{X_{is} \times Y_{sc} \times \text{IRF}_{sc}}{Y_{is}} \quad (10)$$

Nilai *Internal Response Factor* (IRF) dapat dihitung dari hasil injeksi antara larutan internal standar dengan larutan standar dan ditunjukkan dengan Persamaan 11, di mana *is* adalah internal standar, dan *sc* adalah *standard component*.

$$\text{IRF} = \frac{\text{Luas area}_{is} \times \text{Konsentrasi}_{sc}}{\text{Konsentrasi}_{is} \times \text{Luas area}_{sc}} \quad (11)$$

d. Metode penambahan baku

Pada metode penambahan baku atau adisi baku dilakukan dengan cara larutan sampel diadisi (*spiked*) dengan larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya. Selanjutnya larutan disuntikkan ke KCKT melalui 2 cara, yaitu menyuntikkan larutan sampel sebelum *spiked* dan menyuntikkan larutan setelah *spiked*. Metode penambahan baku ini umum digunakan dalam validasi metode untuk penentuan akurasi. Konsentrasi sampel dapat dihitung dengan Persamaan 12, di mana *X* adalah konsentrasi dan *Y* adalah luas area.

$$X_{\text{sampel}} = \frac{Y_{\text{sampel}}}{(Y_{\text{total}} - Y_{\text{sampel}})} \times X_{\text{standar}} \quad (12)$$

e. Normalisasi area

Normalisasi area merupakan metode tanpa baku pembanding. Metode ini dilakukan dengan membandingkan luas puncak senyawa target dengan semua luas puncak yang terdeteksi. Syarat normalisasi area adalah semua komponen dalam sampel harus terbaca sebagai *peak*. Konsentrasi senyawa target dapat dihitung dengan Persamaan 13.

$$X = \frac{\text{Luas area target}}{\text{Luas area total puncak yang terdeteksi}} \times 100\% \quad (13)$$

Keunggulan menggunakan normalisasi area yaitu sangat sederhana, mudah dilakukan tidak memerlukan baku pembanding, dan tidak bergantung pada jumlah sampel yang disuntikkan. Sedangkan kelemahannya yaitu hanya sesuai

untuk detektor yang universal, semua analit harus dapat terelusi dari kolom, dan sulit diaplikasikan untuk matriks sampel yang kompleks.

Berdasarkan penjelasan mengenai metode analisis kuantitatif pada kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), maka pada penelitian ini akan menggunakan metode kurva kalibrasi pada penentuan kadar residu antibiotik tetrasiklin dalam sampel dan metode penambahan baku atau adisi baku pada penentuan nilai akurasi.

2.4 Validasi Metode

Validasi metode adalah suatu penilaian terhadap parameter tertentu dengan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa bahwa data penelitian yang didapatkan dari suatu laboratorium bersangkutan merupakan hasil yang valid dan akurat sehingga dapat dipercaya (Harmita, 2004). Suatu metode yang telah dibuat atau digunakan harus dilakukan validasi dengan cara dievaluasi dan diuji (Riyanto, 2014). Beberapa parameter yang digunakan dalam validasi metode adalah presisi, akurasi, linearitas, selektivitas, batas deteksi dan batas kuantifikasi.

2.4.1 Presisi (Ketelitian)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual sampel yang diukur melalui rata-rata penyebaran hasil individual, ketika prosedur metode analisis yang dilakukan secara berulang-ulang pada sampel yang diambil dari campuran homogen. Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis suatu sampel yang dibuat beberapa kali pengulangan. Selanjutnya ditentukan rata-rata (*mean*), simpangan baku (*SD*), dan persen simpangan baku relatif (% *RSD*) hasil pengukuran (Riyanto, 2014). Pada Persamaan 14 dan 15, *SD* adalah simpangan baku, x_i adalah nilai luas puncak larutan ke- i , \bar{x} adalah nilai arus puncak rata-rata, $n-1$ adalah derajat kebebasan (dengan n adalah banyaknya pengulangan), *RSD* adalah simpangan baku relatif, dan x adalah konsentrasi rata-rata analit.

$$SD = \left[\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (14)$$

$$\% RSD = \frac{SD}{x} \times 100\% \quad (15)$$

Penentuan presisi dapat dilakukan dengan cara yaitu dengan keterulangan (*repeatability*) dan ketertiruan (*reproducibility*). *Repeatability* adalah penentuan presisi yang dilakukan berulang dengan analisis yang sama pada kondisi yang relatif sama dan interval yang pendek (hari yang sama), sedangkan *reproducibility* adalah penentuan presisi yang dilakukan berulang pada analisis dan kondisi yang berbeda, misalnya interval yang panjang (hari yang berbeda).

Menurut aturan Horwitz (1995), metode presisi yang baik menunjukkan % RSD yang diperoleh lebih kecil dari nilai batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz. % RSD Horwitz dapat dihitung menggunakan Persamaan 16, di mana *C* adalah rata-rata konsentrasi (fraksi konsentrasi). Tabel 4 di bawah dapat digunakan sebagai acuan batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz.

$$\text{Horwitz \% CV} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (16)$$

Tabel 4. Batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz

Unit	<i>Repeatability</i> (1/2 %CV _{Horwitz})	<i>Repro. dalam lab</i> (2/3 %CV _{Horwitz})	<i>Repro. antar lab</i> (%CV _{Horwitz})
100 %	1,0	1,3	2,0
10 %	1,4	1,9	2,8
1 %	2,0	2,7	4,0
0,1 %	2,8	3,8	5,7
100 ppm	4,0	5,3	8,0
10 ppm	5,7	7,5	11,3
1 ppm	8,0	10,7	16,0
100 ppb	11,3	15,1	22,6
10 ppb	16,0	21,3	32,0
1 ppb	22,6	30,2	45,3

Sumber : Horwitz (1995)

Menurut Debasis *et al.*, (1982), pada analisis penentuan kadar menggunakan KCKT dapat digunakan batas keberterimaan presisi seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Rentang maksimum yang diperbolehkan

Rentang yang dapat diterima (%)	Penetapan tunggal		Penetapan duplo	
	Metode RSD (%)	Sistem RSD (%)	Metode RSD (%)	Sistem RSD (%)
98,5 - 101,5	0,58	0,41	0,82	0,58
97 - 103	1,2	0,82	1,6	1,2
95-105	1,9	1,4	2,7	1,9
90-110	3,9	2,8	5,5	3,9
90-115	4,8	3,4	6,9	4,8
90-125	6,8	4,8	9,6	6,8
85-115	5,8	4,1	8,2	5,8
75-125	9,7	6,9		
50-150	19,4	13,7		

Sumber : Harmita (2004)

2.4.2 Akurasi (Kecermatan)

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (% *recovery*) analit. Akurasi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode penambahan baku dan metode menggunakan CRM (*Certified Reference Material*) (Harmita, 2004).

Pada metode penambahan baku, sampel dianalisis terlebih dahulu kemudian sejumlah larutan standar ditambahkan ke dalam sampel tersebut, selanjutnya dihomogenkan dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya (AOAC, 2012). Perhitungan % *recovery* dari metode penambahan baku dapat ditetapkan dengan menggunakan Persamaan 17. Metode menggunakan CRM dapat dilakukan dengan membandingkan antara nilai rata-rata hasil pengukuran pengujian dengan nilai sebenarnya dari CRM yang dinyatakan

dalam persentase. Perhitungan % *recovery* menggunakan CRM dapat ditetapkan dengan menggunakan Persamaan 18.

$$\% Recovery = \frac{C \text{ sampel spike} - C \text{ sampel}}{\text{Kadar yang ditambahkan}} \times 100\% \quad (17)$$

atau

$$\% Recovery = \frac{\text{Kadar yang diperoleh}}{\text{Kadar yang ditambahkan}} \times 100\% \quad (18)$$

Akurasi dalam metode analisis juga dapat ditentukan dengan uji bias (*error test*) menggunakan uji t. Nilai akurasi dapat diterima jika memenuhi batas keberterimaan uji t, yakni jika nilai t hitung lebih kecil dari nilai t Tabel. Hal ini menyatakan bahwa metode analisis yang diterapkan tidak ada bias pada hasil pengukuran. Perhitungan t hitung dapat ditentukan dengan menggunakan Persamaan 19. Tabel 6 dapat menunjukkan persyaratan % *recovery* untuk beberapa konsentrasi analit.

$$t_{\text{hitung}} = \frac{[C_{\text{CRM}} - C_{\text{Hasil}}]}{\sqrt{U_{\text{CRM}}^2 + \sqrt{\frac{SD_{\text{Hasil}}^2}{n}}}} \quad (19)$$

Tabel 6. Persyaratan presisi dan % *recovery*

Analit	Ratio Analit	Unit	RSD (%)	Recovery (%)
100	1	100 %	1,3	98-102
10	10	10 %	1,9	98-102
1	10	1 %	2,7	97-103
0,1	10	0,10 %	3,8	95-105
0,01	10	100 ppm	5,3	90-107
0,001	10	10 ppm	7,5	80-110
0,0001	10	1 ppm	11	80-110
0,00001	10	100 ppb	15	80-110
0,000001	10	10 ppb	21	60-115
0,0000001	10	1 ppb	30	40-120

Sumber : AOAC (2012)

2.4.3 Linearitas

Linearitas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis yang memberikan respon secara langsung sehingga memperoleh hasil uji yang baik, serta proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Linearitas secara matematis dinyatakan sebagai persamaan garis linear seperti pada Persamaan 20 dengan a adalah *intercept* (Persamaan 21), b adalah *slope* (Persamaan 22) dan r adalah koefisien korelasi (Persamaan 23).

$$y = a + bx \quad (20)$$

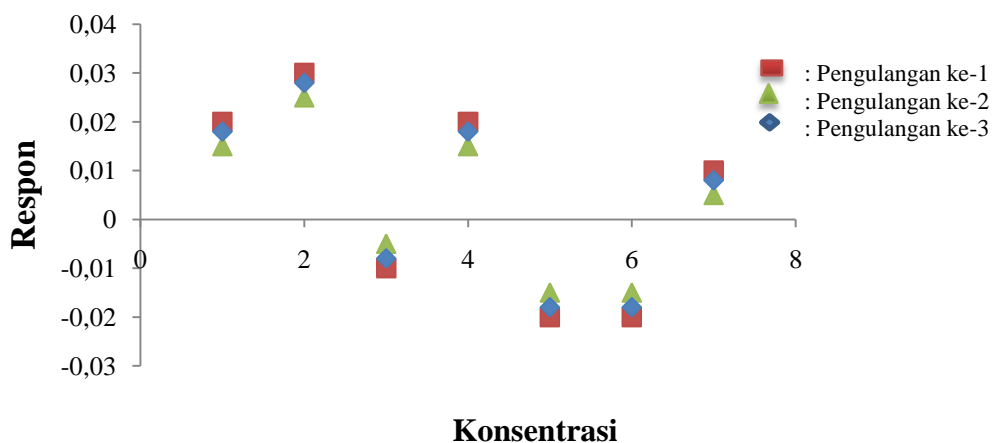
$$a = \frac{\sum Y - b(\sum X)}{n} \quad (21)$$

$$b = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} \quad (22)$$

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[(n \sum X^2) - (\sum X)^2][(n \sum Y^2) - (\sum Y)^2]}} \quad (23)$$

Linearitas dapat ditentukan dari nilai koefisien korelasi (r). Nilai (r) yang mendekati 1 menggambarkan bahwa konsentrasi larutan standar sebanding dengan respon/intensitas hasil pengukuran. Menurut Eurachem dan AOAC, nilai koefisien korelasi (r) yang memenuhi persyaratan adalah sebesar $\geq 0,990$ (Eurachem, 2014) dan $\geq 0,9980$ (AOAC, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa hasil pengukuran tersebut dapat diterima sebagai pembandingan atau acuan dalam pengukuran sampel.

Linearitas juga dapat dilihat dari nilai residualnya, yakni memiliki nilai residual yang terdistribusi secara acak di sekitar garis pusat seperti Gambar 10. Selain itu, linearitas dari suatu metode juga dapat dievaluasi berdasarkan nilai respon faktornya. Respon faktor menggambarkan perubahan respon (dalam hal ini intensitas terukur) terhadap perubahan konsentrasi larutan (Casson *and* Farmer, 2014). Gambar 10 menunjukkan bahwa nilai residual terdistribusi secara acak di sekitar garis pusat dan tidak membentuk pola tertentu sehingga diasumsikan linearitas telah terpenuhi.



Gambar 10. Residual plot hasil pengukuran larutan standar (Osborne *and* Waters, 2002)

2.4.4 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan yang hanya dapat mengukur zat tertentu secara seksama dan cermat meskipun mungkin terdapat komponen lain dalam matriks sampel (Harmita, 2004). Selektivitas dapat ditentukan dari kromatogram pengukuran larutan standar yang memiliki puncak baik dengan tidak terbentuk *tailing*.

Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s). Pada metode KCKT, sistem yang dipakai harus bersifat selektif untuk zat yang ditentukan, artinya puncak zat-zat tersebut pada kromatogram harus terpisah dari zat lain, misalnya agar terjadi pemisahan yang baik terhadap zat yang strukturnya mirip, maka harga resolusinya sebaiknya lebih besar dari 1,5.

Selektivitas juga bisa dilakukan melalui uji t dan uji F untuk melihat beda nyata antara pengukuran hasil analisis larutan standar tanpa campuran terhadap standar campuran. Uji t digunakan untuk mengevaluasi nilai konsentrasi rata-rata larutan standar tanpa campuran dan larutan standar campuran. Uji F digunakan untuk membandingkan antara dua simpangan baku. Jika nilai t hitung dan F hitung lebih kecil dari nilai t Tabel dan F Tabel, maka dapat dikatakan metode analisis ini

memiliki selektivitas yang baik. Nilai F hitung dapat ditentukan dengan menggunakan Persamaan 24. Dimana $S1$ dan $S2$ adalah simpangan baku. Nilai simpangan baku yang lebih besar ditempatkan sebagai pembilang sehingga $F > 1$.

$$F \text{ Hitung} = \frac{S1^2}{S2^2} \quad (24)$$

2.4.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi

Batas deteksi atau *limit of detection* (LoD) merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel atau konsentrasi terendah yang dapat dideteksi melalui metode yang diterapkan yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko (Riyanto, 2014). Sedangkan batas kuantifikasi atau *limit of quantification* (LoQ) merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama serta parameter pada analisis renik (Harmita, 2004).

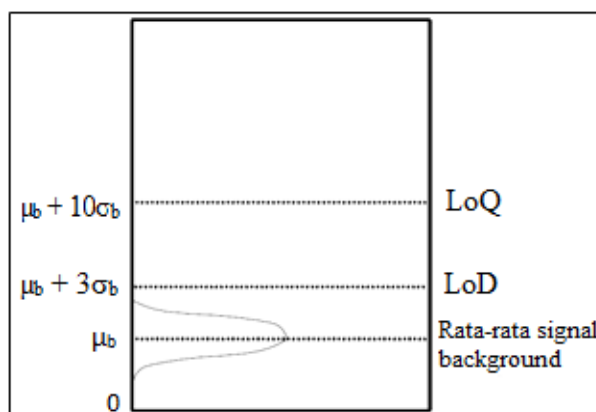
Batas deteksi dapat ditentukan dengan penentuan blanko. Penentuan blanko diterapkan ketika analisis blanko memberikan hasil intensitas tidak sama dengan nol. Batas deteksi dinyatakan sebagai konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dan batas kuantifikasi dinyatakan sebagai konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah sepuluh standar deviasi seperti Persamaan 25 dan Persamaan 26, di mana x adalah konsentrasi rata-rata blanko dan SD adalah standar deviasi.

$$\text{LoD} = x + 3 \text{ SD} \quad (25)$$

$$\text{LoQ} = x + 10 \text{ SD} \quad (26)$$

Cara lainnya yaitu melalui penentuan rasio S/N (*signal to noise ratio*). Penentuan dengan menggunakan rasio S/N dilakukan dengan memperhatikan puncak ke puncak kebisingan yang berada di sekitar waktu retensi analit, lalu konsentrasi analit yang akan menghasilkan sinyal yang sama dengan nilai tertentu dapat diperkirakan (Riyanto, 2014). Kebisingan (*noise*) dapat diukur secara manual atau otomatis dari instrumen. Rasio S/N didapatkan dari pembagian antara konsentrasi rata-rata dan SD (Utami, 2017). Nilai LoD yaitu nilai konsentrasi saat ratio S/N =

3, sedangkan nilai LoQ yaitu nilai konsentrasi saat rasio S/N = 10. Posisi LoD dan LoQ dalam kromatogram dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Posisi LoD, LoQ dan rata-rata sinyal (Riyanto, 2014)

Batas deteksi juga dapat ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi. Respon instrumen y diasumsikan berhubungan linear dengan konsentrasi x standar untuk rentang konsentrasi yang terbatas. Hal ini dapat dinyatakan dengan persamaan regresi (Persamaan 20). Model ini digunakan untuk menghitung sensitivitas, batas deteksi, dan batas kuantifikasi. Batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dihitung sesuai Persamaan 27 dan Persamaan 28, di mana $S_{y/x}$ adalah simpangan baku fungsi regresi (Miller *and* Miller, 1991).

$$\text{LoD} = \frac{3 S_{y/x}}{\text{Slope}} \quad (27)$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 S_{y/x}}{\text{Slope}} \quad (28)$$

dengan,

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y-y_i)^2}{n-2}} \quad (29)$$

2.5 Ketidakpastian Pengukuran

Pengukuran merupakan suatu proses yang bertujuan untuk menetapkan nilai besaran dalam satuan. Dalam pengukuran diperlukan estimasi ketidakpastian pengukuran agar hasil analisis yang didapatkan lebih terjamin. Estimasi

ketidakpastian pengukuran adalah tahapan untuk estimasi ketidakpastian pengukuran dalam pengukuran atau pengujian, di mana semaksimal mungkin menggunakan metode statistik yang sesuai (Riyanto, 2014). Konsep mengenai ketidakpastian pengukuran didasarkan pada suatu besaran teramati yang diperoleh dari hasil pengukuran.

Sumber ketidakpastian pengukuran dapat disebabkan dari beberapa kemungkinan, misalnya karena gangguan matriks, kondisi lingkungan saat analisis, tata cara sampling dan preparasi sampel, kalibrasi, ketidakpastian massa dan alat volumetrik, perkiraan dan asumsi, nilai acuan, teknik pengukuran serta variasi acak (Riyanto, 2014). Nilai ketidakpastian juga menyatakan mutu hasil dalam pengukuran maupun pengujian. Jika semakin kecil nilai dari ketidakpastian pengukuran, maka semakin baik hasil pengujian tersebut (Komite Akreditasi Nasional, 2003).

Klasifikasi komponen ketidakpastian pengukuran menurut metode yang digunakan untuk menaksir nilai numeriknya yaitu sebagai berikut (Sunardi dkk., 2007).

- a. Tipe A. Tipe A adalah komponen yang dievaluasi dengan analisis statistik berdasarkan data percobaan dan dihitung dari serangkaian pengamatan. Persamaan 31 menyatakan ketidakpastian baku (μ) untuk tipe A, di mana s adalah simpangan baku dan n adalah jumlah pengamatan.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}} \quad (30)$$

$$\mu = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (31)$$

- b. Tipe B. Tipe B adalah komponen ketidakpastian yang dievaluasi dengan cara selain analisis statistik dari serangkaian pengamatan, yakni dengan berdasarkan informasi yang dapat dipercaya (sebagai data sekunder), seperti spesifikasi pabrik, data pustaka maupun data validasi metode. Persamaan 32 dan 33 menunjukkan nilai ketidakpastian baku (μ) untuk tipe B pada distribusi normal

dan distribusi *rectangular*, di mana QU adalah nilai galat (\pm) pada sumber ketidakpastian.

$$\mu = \frac{QU}{2} \quad (32)$$

$$\mu = \frac{QU}{\sqrt{3}} \quad (33)$$

2.5.1 Ketidakpastian Gabungan (μ_c)

Ketidakpastian pengukuran gabungan (μ_c) dapat ditentukan dengan Persamaan 34, di mana X adalah sumber ketidakpastian baku, μ adalah nilai ketidakpastian baku, dan n adalah jumlah pengulangan.

$$\mu_c = \text{Kadar} \times \sqrt{\left(\frac{\mu X_1}{X_1}\right)^2 + \left(\frac{\mu X_2}{X_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{\mu X_n}{X_n}\right)^2} \quad (34)$$

2.5.2 Ketidakpastian Diperluas (U)

Tahap akhir dari perhitungan ketidakpastian yaitu dengan menentukan nilai ketidakpastian diperluas (U) dengan tingkat kepercayaan tertentu. Persamaan 35 dapat digunakan untuk menentukan nilai ketidakpastian diperluas, di mana k adalah faktor cakupan dan μ_c adalah ketidakpastian gabungan. Jika tingkat kepercayaan 95%, maka nilai faktor cakupan (k) yang digunakan dalam perhitungan ketidakpastian diperluas yaitu sebesar 1,96 atau 2. Jika tingkat kepercayaan bervariasi, maka nilai faktor cakupan juga bervariasi (Riyanto, 2014).

$$U = k \times \mu_c \quad (35)$$

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2022 – April 2022 di Unit Pelayanan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat utama dan alat penunjang. Alat utama yang digunakan adalah sistem KCKT (Shimadzu) dengan detektor SPD-M20A, *degasser* DGU-20A, pompa LC-20AD, oven CTO-20A, dan kolom C18 (Hypersil ODS) 5 μ m, 4,6mm x 250mm. Sedangkan alat penunjang lainnya yang digunakan adalah *syringe* KCKT, sonikator Branson 1510, pompa vakum, botol vial 2 mL 9mm, mikropipet, neraca analitik, pH meter, blender, *magnetic stirrer*, *centrifuge*, tabung sentrifus, alat-alat gelas, dan spatula.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar tetrasiklin, metanol (*p.a*), asetone nitril (*p.HPLC*), *aquapure*, asam sitrat monohidrat (E. Merck), dinatrium hidrogen fosfat anhidrat (E. Merck), dinatrium EDTA dihidrat (E. Merck), HCl 0,1 N, membran filter Whatman 0,45 μ m Nylon, *syringe* filter Whatman 0,2 μ m PTFE, kertas saring, dan daging ikan mas.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging ikan mas yang diperoleh dari 8 lokasi pasar di Kota Bandar Lampung, yaitu Pasar Rajabasa, Pasar Untung, Pasar Way Kandis, Pasar Way Halim, Pasar Cimeng, Pasar Tugu, Pasar Bambu Kuning, dan Pasar Sukarame. Sampel yang diperoleh dalam kondisi segar kemudian dibersihkan secara terpisah dari sisik, kotoran, kulit dan tulangnya. Masing-masing sampel dihaluskan terlebih dahulu dengan blender sehingga didapatkan sampel daging ikan ± 50 gram dari tiap lokasi pasar.

3.3.2 Pembuatan Larutan

a. Larutan buffer McIlvaine pH 4

Larutan asam sitrat dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 5,2525 g asam sitrat monohidrat dalam gelas kimia dengan akuades. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

Larutan natrium fosfat dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 7,1025 g dinatrium hidrogen fosfat anhidrat dalam gelas kimia dengan akuades. Kemudian larutan tersebut dimasukkan dalam labu ukur 250 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

Larutan Buffer McIlvaine dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 200 mL larutan asam sitrat dan 125 mL larutan natrium fosfat, lalu diukur pH nya dengan pH meter hingga pH 4 (Laboratory Quality Assurance Division, 2007).

b. Larutan buffer McIlvaine-EDTA

Larutan ini dibuat menggunakan dinatrium EDTA dihidrat sebanyak 12,98 g yang dilarutkan ke dalam 325 mL buffer McIlvaine (Laboratory Quality Assurance Division, 2007).

c. Larutan *stock* baku tetrasiklin

Larutan baku 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang standar tetrasiklin sebanyak 10 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu dihomogenkan.

d. Larutan baku kerja tetrasiklin

Larutan baku kerja disiapkan dengan cara sebanyak 2,5 mL larutan *stock* dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan metanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan baku konsentrasi 250 ppm.

3.3.3 Tahap Preparasi

a. Ekstraksi sampel

Sampel yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 50 g dan ditambahkan 40 mL Buffer McIlvaine-EDTA (pH 4). Selanjutnya dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit, lalu supernatan diambil. Endapan yang diperoleh ditambahkan 20 mL Buffer McIlvaine-EDTA dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan endapan ditambahkan lagi dengan 20 mL buffer McIlvaine-EDTA kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dikumpulkan dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditepatkan dengan HCl 0,1 N hingga tanda batas, larutan inilah yang disebut larutan sampel (Laboratory Quality Assurance Division, 2007).

b. Preparasi fase gerak

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini yaitu asetonitril dan air. Fase gerak dimasukkan ke dalam wadah eluen dan dilakukan sonikasi selama 10-15 menit untuk menghilangkan gelembung-gelembung kecil. Sebelum disonikasi,

fase gerak air (*aquapure*) disaring menggunakan pompa vakum dan membran filter Nylon 0,45 μm .

c. Preparasi alat

Pada instrumen KCKT dibuat dalam kondisi awal seperti berikut:

Tabel 7. Kondisi awal instrumen KCKT

Parameter	Pengaturan
Kolom	C18
Sistem	Fase terbalik
Fase gerak	Asetonitril : air = 35 : 65
Laju alir	1 mL/menit
Volume injeksi	12 μL
Detektor	<i>Photo-Diode Array</i> (PDA)

3.3.4 Optimasi KCKT

a. Optimasi komposisi fase gerak

Optimasi ini dilakukan dengan variasi komposisi fase gerak asetonitril dan air yaitu 40:60; 35:65; dan 30:70. Kondisi optimum ditentukan dengan waktu retensi, bentuk *peak*, dan efisiensi kolom puncak kromatogram masing-masing komposisi fase gerak tersebut.

b. Optimasi laju alir fase gerak

Optimasi ini dilakukan dengan variasi laju alir fase gerak dari 0,5; 1,0 dan 1,5 mL/menit menggunakan komposisi fase gerak optimum yang telah ditentukan sebelumnya. Kondisi optimum ditentukan dengan waktu retensi, bentuk *peak*, dan efisiensi kolom puncak kromatogram masing-masing laju alir fase gerak tersebut.

3.3.5 Uji Validasi Metode

Setelah ditentukan kondisi optimum KCKT, selanjutnya dilakukan uji validasi metode dengan parameter yaitu linearitas, presisi, akurasi, selektivitas, batas deteksi dan batas kuantifikasi.

a. Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi larutan standar tetrasiklin secara linear dengan minimal 5 konsentrasi standar, dengan variasi konsentrasi 2 - 10 ppm (International Conference on Harmonization, 2014). Parameter linearitas dapat dihitung dengan melihat nilai koefisien korelasi (r) berdasarkan Persamaan 23 dan melalui pengukuran residual plot menggunakan larutan standar tetrasiklin.

b. Presisi

1) *Repeatability*

Sebanyak 0,1 mL larutan standar 250 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan larutan sampel hingga tanda batas. Pengukuran presisi *repeatability* dilakukan menggunakan KCKT dengan 6 kali replikasi pada hari yang sama dan kemudian ditentukan nilai % RSD berdasarkan Persamaan 15 (Eurachem, 2014).

2) *Reproducibility*

Sebanyak 0,1 mL larutan standar 250 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan larutan sampel hingga tanda batas. Selanjutnya dilakukan pengulangan 6 kali replikasi. Pengukuran presisi *reproducibility* menggunakan KCKT dilakukan pengulangan 3 kali pada hari yang berbeda (Eurachem, 2014).

c. Akurasi

Sebanyak 0,1 mL larutan standar tetrasiklin 250 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan larutan sampel hingga tanda batas.

Selanjutnya dilakukan pengulangan 6 kali replikasi dan ditentukan % *recovery*

dengan menggunakan Persamaan 17 (International Conference on Harmonization, 2014).

d. Selektivitas

Penentuan selektivitas dilakukan dengan membuat larutan standar tetrasiklin murni dan larutan standar tetrasiklin campuran. Kemudian selektivitas ditentukan berdasarkan kesamaan waktu retensi antara larutan standar tetrasiklin murni dan larutan standar campuran (Eurachem, 2014).

e. Batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ)

Penentuan LoD dan LoQ untuk sampel dapat dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm (International Conference on Harmonization, 2014).

3.3.6 Ketidakpastian Pengukuran

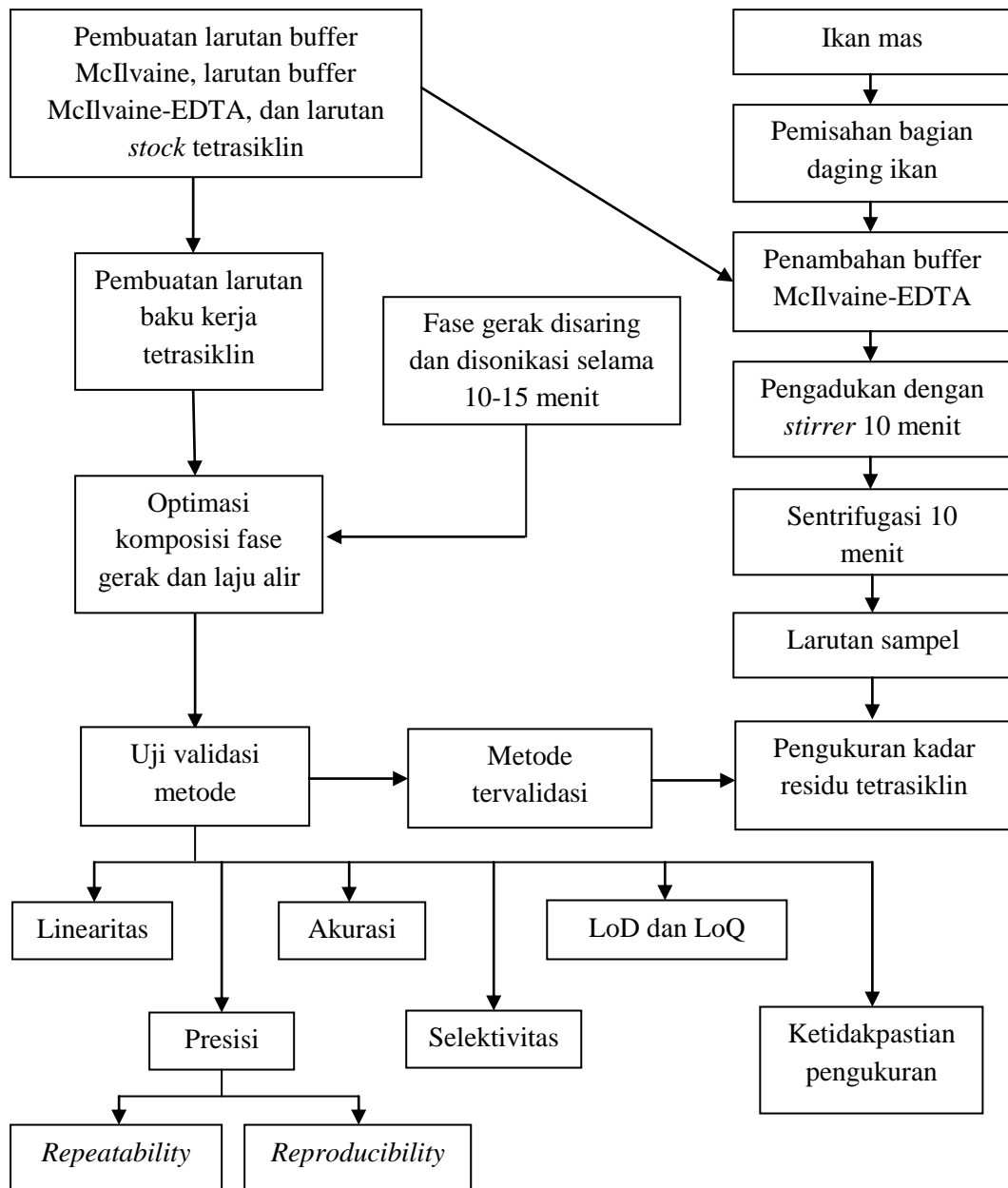
Estimasi nilai ketidakpastian dapat dihitung setelah diperoleh data hasil pengukuran dalam validasi metode penentuan tetrasiklin ikan mas menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Data tersebut kemudian dilanjutkan dengan perhitungan ketidakpastian pengukuran dari masing-masing faktor yang dapat mempengaruhi pengujian tetrasiklin.

3.3.7 Penentuan Kadar Residu Tetrasiklin pada Daging Ikan Mas

Larutan sampel dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke labu ukur 10 mL, kemudian diencerkan dengan metanol hingga tanda batas. Penentuan dilakukan dengan menggunakan 8 sampel ikan mas yang telah dipreparasi dan menggunakan metode KCKT yang telah divalidasi. Kadar residu tetrasiklin kemudian dapat ditentukan menggunakan Persamaan 36, di mana C_x adalah konsentrasi analit yang diukur dari persamaan regresi (mg/L), Fp adalah faktor pengenceran, V adalah volume sampel (L), dan B adalah berat sampel (kg).

$$\text{Kadar residu (mg/kg)} = \frac{C_x \times Fp \times V}{B} \quad (36)$$

Bagan alir dari penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Penentuan kadar antibiotik tetrasiklin dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) optimal pada komposisi fase gerak 35 : 65 (asetonitril : air) dengan laju alir 0,5 mL/menit.
2. Parameter linearitas menghasilkan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9980; presisi *repeatability* menghasilkan nilai %RSD sebesar 1,35% dan presisi *reproducibility* menghasilkan nilai %RSD sebesar 1,11%; 0,96% dan 1,14%; akurasi menunjukkan nilai perolehan kembali (*%recovery*) sebesar 101,05%; selektivitas menunjukkan waktu retensi yang sama antara larutan standar murni tetrasiklin dan larutan standar tetrasiklin campuran; batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ) diperoleh sebesar 0,27 ppm dan 0,90 ppm. Parameter validasi metode penentuan kadar residu antibiotik tetrasiklin pada sampel ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan KCKT ini telah menunjukkan hasil yang baik.
3. Hasil pengukuran kadar residu antibiotik tetrasiklin pada sampel ikan mas dari 8 lokasi pasar di Bandar Lampung berada pada rentang 21,77 ppm - 38,58 ppm dengan nilai ketidakpastian sebesar $\pm 0,87$ sampai $\pm 1,42$, di mana hasil kadar residu tersebut telah melebihi batas maksimum residu yang diperbolehkan.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan melakukan penentuan kadar residu antibiotik tetrasiklin juga terhadap jenis atau komoditas ikan budidaya air tawar lainnya maupun pada lingkungan perairan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Selain itu, disarankan melakukan verifikasi terlebih dahulu terhadap metode analisis sebelum digunakan pada laboratorium pengujian secara rutin untuk meningkatkan nilai keabsahan dari metode analisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Agadellis, E., Tartaglia, A., Locatelli, M., Kabir, A., Furton, K. G., & Samanidou, V. (2020). Mixed-Mode Fabric Phase Sorptive Extraction of Multiple Tetracycline Residues from Milk Samples Prior to High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Analysis. *Microchemical Journal*, 105437(159), 1-10.
- Anastasia, Y. (2011). Teknik Analisis Residu Golongan Tetrasiklin dalam Daging Ayam Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Buletin Teknik Pertanian*, 16(2), 68–73.
- Ardianingsih, R. (2009). Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Proses Analisa Deteksi Ion. *Berita Dirgantara*, 10(4), 101–104.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2012). *Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F*.
- Barani, A. & Fallah, A. A. (2014). Occurrence of Tetracyclines, Sulfonamides, Fluoroquinolones and Florfenicol in Farmed Rainbow Trout in Iran. *Food and Agricultural Immunology*, 26(3), 1–10.
- Biomall. (2009). *HPLC: High Performance Liquid Chromatography*. Laboratory Equipments and Supplies. India.
- Bramantio. (2001). *Morfologi Ikan Air Tawar*. Penerbit Swadaya. Jakarta.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy Use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture: A Growing Problem for Human and Animal Health and for The Environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137–1144.
- Casson, R. J. & Farmer, L. D. (2014). Understanding and Checking the Assumptions of Linear Regression: A Primer for Medical Researchers. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 42(6), 590–596.

- Center for Drug Evaluation and Research. (1994). *Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods*. US Department of Health and Human Services. Washington.
- Codex Alimentarius Commission. (2017). *Maximum Residue Limits for Residues of Veterinary Drugs in Foods*. Update as at the 40th Session of the Codex Alimentarius Commission.
- Debesis, E. I. L. E. E. N., Boehlert, J. P., Givand, T. E., & Sheridan, J. C. (1982). Submitting HPLC Methods to the Compendia and Regulatory Agencies. *Journal of Pharmaceutical Technology*, 2(9), 120-129.
- Depkes RI. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Etikaningrum & Iwantoro, S. (2017). Kajian Residu Antibiotika Pada Produk Ternak Unggas di Indonesia. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 5(1), 29–33.
- Eurachem, G. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Laboratory of the Government Chemists. London.
- Grigorakis, K. & Rigos, G. (2011). Aquaculture Effects on Environmental and Public Welfare - The Case of Mediterranean Mariculture. *Chemosphere*, 855(6), 899–919.
- Hakimah, N., Satria, G. D., Pawestri, W., & Indarjulianto, S. (2019). Validasi Metode Analisis Tetrasiklin pada Ikan Nila (*Oreochromis sp.*) menggunakan Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Jurnal Sain Veteriner*, 37(2), 213–218.
- Hansen, S., Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. (2012). *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. John Wiley and Sons Ltd. West Sussex.
- Harmita, H. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117–135.
- Harvey, D. (2000). *Modern Analytic Chemistry Spectroscopy*. McGraw-Hill Companies. United States of America.

- Hastein, T., Hjeltnes, B., Lillehaug, A., Utne Skare, J., Berntssen, M., & Lundebye, A. K. (2006). Food Safety Hazards that Occur During the Production Stage: Challenges for Fish Farming and the Fishing Industry. *Revue Scientifique et Technique (Rev Sci Tech)*, 25(2), 607–625.
- Hendayana, S. (2006). *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. PT. Remaja Rosdakarya. Bandung.
- Horwitz, W. (1995). Protocol for The Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies. *Pure and Applied Chemistry*, 67(2), 331–343.
- International Conference on Harmonization (ICH). (2014). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Somatek Inc. USA.
- Irianto. (2005). Faktor-Faktor Lingkungan Abiotik Air Tawar. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*, 2(11).
- Katzung, B. G. (2010). *Farmakologi Dasar dan Klinik* (Edisi 10). Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kemenkes RI. (2011). *Pedoman Pelayanan Kefarmasian untuk Terapi Antibiotik*. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- Khairuman, Sudenda, D., & Gunadi, B. (2008). *Budidaya Ikan Mas Secara Intensif*. PT Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Komite Akreditasi Nasional (KAN). (2003). *Pedoman Evaluasi dan Pelaporan Ketidakpastian Pengukuran*.
- Laboratory Quality Assurance Division. (2007). *Qualitative Identification of Tetracyclines*. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. USA.
- Li, Y., Zhu, N., Chen, T., Ma, Y., & Li, Q. (2018). A Green Cyclodextrin Metal-Organic Framework as Solid-Phase Extraction Medium for Enrichment of Sulfonamides Before Their HPLC Determination. *Microchemical Journal*, 138, 401–407.
- Limbong, T. & Limbong, R. (2018). Implementasi Metode *Simple Additive Weighting* dalam Pemilihan Bibit untuk Budidaya Ikan Mas. *Jurnal Teknik Informatika Kaputama*, 2(1), 115–122.

- Liu, Y., Yang, H., Yang, S., Hu, Q., Cheng, H., Liu, H., & Qiu, Y. (2013). High-Performance Liquid Chromatography using Pressurized Liquid Extraction for the Determination of Seven Tetracyclines in Egg, Fish and Shrimp. *Journal of Chromatography B*, 917–918, 11–17.
- Lou, J., Xu, X., Gao, Y., Zheng, D., Wang, J., & Li, Z. (2016). Preparation of Magnetic Activated Carbon from Waste Rice Husk for Determination of Tetracycline Antibiotics in Water Samples. *RSC Advances*, (113), 112166–112174.
- Lupin, H. (2009). Human Health Aspects of Drug and Chemical Use in Aquaculture. *Options Mediterraneennes*, 103(86), 95–103.
- Mamani, M. C. V., Reyes, F. G. R., & Rath, S. (2009). Multiresidue Determination of Tetracyclines, Sulphonamides and Chloramphenicol in Bovine Milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 117(3), 545–552.
- Mariyono & Sundana, A. (2002). Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah pada Ikan Air Tawar yang disebabkan oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian*, 7(1), 33–36.
- Martínez, J. L. (2017). Effect of Antibiotics on Bacterial Populations: A Multi-Hierarchical Selection Process. *F1000 Research*, 6(51), 1–10.
- Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography* (5th Edition). John Wiley and Sons Ltd. Switzerland.
- Miller, J. N. & Miller, J. C. (1991). *Statistika untuk Kimia Analitik, diterjemahkan oleh Suroso*. ITB. Bandung.
- Mulyani, Y., Bachtiar, E., & Kurnia, M. U. (2013). Peranan Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Mangrove Terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 4(1), 1–9.
- Muriuki, F. K., Ogara, W. O., Njeruh, F. M., & Mitema, E. S. (2001). Tetracycline Residue Levels in Cattle Meat from Nairobi Slaughter House in Kenya. *Journal of Veterinary Science*, 2(2), 97–101.
- Murningsih, T. & Chairul. (2000). Mengenal HPLC: Peranannya dalam Analisa dan Proses Isolasi Bahan Kimia Alam. *Berita Biologi*, 5(2), 261–272.
- Narantaka. (2012). *Pembenihan Ikan Mas*. Javalitera. Yogyakarta.

- Nurhasnawati, H., Jubaidah, S., & Elfia, N. (2016). Penentuan Kadar Residu Tetrasiklin HCl pada Ikan Air Tawar yang Beredar di Pasar Segiri Menggunakan Metode Spektrofotometri Ultra Violet. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 2(2), 173–178.
- Orlando, E. A. & Simionato, A. V. C. (2013). Extraction of Tetracycline Antibiotic Residues from Fish Filet: Comparison and Optimization of Different Procedures using Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography A*, 1307, 111–118.
- Osborne, J. W. & Waters, E. (2002). Four Assumptions of Multiple Regression that Researchers Should Always Test. *Practical Assessment, Research and Evaluation*, 8(2), 1–5.
- Pawestri, W., Satria, G. D., Hakimah, N., & Yudhabuntara, D. (2019). Deteksi Kejadian Residu Tetrasiklin pada Daging Ikan Nila di Kota Yogyakarta dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Jurnal Sain Veteriner*, 37(2), 185–192.
- Prihatman, K. (2000). *Budidaya Ikan Mas*. Kantor Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi. Jakarta.
- Puradewa, L. (2005). *Validasi Metode Analisis Residu Antibiotika Oksitetrasiklin dan Tetrasiklin pada Udang Secara HPLC*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rahmawati, A. R., Ulkhaq, M. F., Susanti, D., Kenconoajati, H., & Fasya, A. H. (2021). Identifikasi Bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Edwardsiella ictalury* pada Ikan Hidup yang akan dilalulintaskan dari Daerah Istimewa Yogyakarta. *Journal of Marine and Coastal Science*, 10(2), 68–73.
- Rao, C. R. M., Kumar, L. C. A., & Sekharan, C. B. (2015). Quantitative Analysis of Oxytetracycline Residues in Honey by High Performance Liquid Chromatography. *International Research Journal of Biological Sciences*, 4(5), 59–65.
- Riyanto. (2014). *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi* (Edisi 1). Penerbit Deepublish. Yogyakarta.
- Romero, J., Feijoo, C. G., & Navarette, P. (2012). *Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives*. Universidad de Chile. Chile.

- Rosydiati & Saleh, E. K. (2019). Karakterisasi Puncak Kromatogram dalam High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Terhadap Perbedaan Fase Gerak, Laju Alir, dan Penambahan Asam dalam Analisis *Indole Acetic Acid* (IAA). *Kandaga*, 1(2), 65–73.
- Rudiyanti, S. & Ekasari, A. D. (2009). Pertumbuhan dan Survival Rate Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn) Pada Berbagai Konsentrasi Pestisida Reagent 0,3 G. *Jurnal Saintek Perikanan*, 5(1), 39–47.
- Saleh, H., Elhenawee, M., M Hussien, E., Ahmed, N., & Ibrahim, A. E. (2021). Validation of HPLC-UV Multi-Residue Method for the Simultaneous Determination of Tetracycline, Oxytetracycline, Spiramycin and Neospiramycin in Raw Milk. *Food Analytical Methods*, 14(1), 36-43.
- Saniwanti, Nuraini, & Agustina, D. (2015). Studi Residu Antibiotik Daging Broiler yang Beredar di Pasar Tradisional Kota Kendari. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 2(2), 30–38.
- Sanjayadi & Violita, L. B. (2020). Penetapan Kadar Tetrasiklin dalam Air Limbah dengan High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector (HPLC-PDA). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 6(2), 237–242.
- Saputra, S. A. & Arfi, F. (2020). Analisis Residu Kloramfenikol pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) Menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Amina*, 1(3), 126–131.
- Sari, D. K. (2021). *Validasi Metode Penentuan Kadar Residu Antibiotik Tetrasiklin pada Ikan Mas (Cyprinus carpio) menggunakan Spektrofotometri UV*. Universitas Lampung. Lampung.
- Sekkin, S. & Kum, C. (2011). *Antibacterial Drug in Fish Farm: Application and Its Effect*. Adnan Manderes University Press. Turki.
- SNI 01-6130-1999. (1999). *Induk Ikan Mas (Cyprinus carpio Linneaus) strain Majalaya Kelas Induk Pokok (Parent Stock)*. Badan Standardisasi Nasional.
- SNI 01-6134-1999. (1999). *Induk Ikan Mas (Cyprinus carpio Linneaus) strain Sinyonya Kelas Induk Pokok (Parent Stock)*. Badan Standardisasi Nasional.

- SNI 01-6366-2000. (2000). *Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan*. Badan Standardisasi Nasional.
- SNI 2354.11:2009. (2009). *Penentuan Residu Tetrasiklin dan Derivatnya dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Pada Produk Perikanan*. Badan Standardisasi Nasional.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (3th Editio). John Wiley and Sons, Inc. Canada.
- Subroto & Tjahjati. (2001). *Pedoman Pengobatan Hewan Ternak*. Benteng Pustaka. Yogyakarta.
- Sunardi, Susanna, T., & Nuraini, E. (2007). Ketidakpastian Pengukuran Pada Metode Aanc Untuk Analisis N, P, K, Si, Al, Cu, Fe dalam Cuplikan Sedimen. *Pusat Teknologi Akselerator dan Proses Bahan*, (ISSN 0216-3128), 256–262.
- Supriyadi, H., Tauhid, & Effendi, J. (2003). Identifikasi Jasa Penyebab Penyakit pada Benih Ikan Patin Jambal (*Pangasius djambal*) serta Cara Penanggulangannya. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 9(4), 37–41.
- Susanti, M. & Dachriyanus. (2010). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. LPTIK Universitas Andalas. Sumatera Barat.
- Susanto, H. (2014). *Budi Daya 25 Ikan di Pekarangan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Thomas. (2000). *Common Carp (Cyprinus carpio)*. Texas State University. San Marcus.
- Tjay, T. H. & Rahardja, K. (2007). *Obat-Obat Penting Khasiat Penggunaan dan Efek Sampingnya* (Edisi 6). PT. Elex Media Komputindo. Jakarta.
- Uma, A. & Rebecca, G. (2018). Antibiotic Resistance in Bacterial Isolates from Commercial Probiotics Used in Aquaculture. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 1(7), 1737–1743.
- Utami, A. R. (2017). Verifikasi Metode Pengujian Sulfat dalam Air dan Air Limbah Sesuai SNI 6989.20 : 2009. *Jurnal Teknologi Proses dan Inovasi Industri*, 2(1), 19–25.

- Utami, E. R. (2012). Antibiotika, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *Jurnal Sainstis*, 1(1), 124–138.
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750.
- Wibowo, A., Muliana, L., & Prabowo, M. H. (2010). Analisis Residu Antibiotik Kloramfenikol dalam Daging Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy*, Lac) Menggunakan Metode High Performance Liquid Chromatography. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 7(1), 23–37.
- Yuningsih. (2004). *Keberadaan Residu Antibiotika dalam Produk Peternakan (Susu dan Daging)*. Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan, Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- Zhong, Y., Chen, Z. F., Dai, X., Liu, S. S., Zheng, G., Zhu, X., Liu, S., Yin, Y., Liu, G., & Cai, Z. (2018). Investigation of The Interaction Between The Fate of Antibiotics in Aquafarms and Their Level in The Environment. *Journal of Environmental Management*, 207, 219–229.