

UJI KUALITATIF DAN KUANTITATIF TETRASIKLIN DALAM SIMULASI SAMPEL SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Ni Ketut Esati^{1*}, Kadek Duwi Cahyadi¹, Gusti Ayu Dewi Lestari¹

¹Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Farmasi Mahaganesha, Jalan Tukad Barito No. 57, Renon-Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Bali, Indonesia, 80226

*Korespondensi: esati0110@gmail.com

ABSTRAK

Analisis kualitatif dengan pereaksi warna merupakan metode pendahuluan yang dapat dilakukan untuk menentukan keberadaan suatu zat. Perbedaan sensitivitas pada tiap pereaksi terhadap suatu zat dapat berbeda-beda. Uji kuantitatif tetrasiklin pada sampel menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis memerlukan metode ekstraksi yang paling optimal sehingga memberikan hasil yang baik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari batas deteksi suatu pereaksi warna terhadap tetrasiklin, dan analisis kuantitatif yang diawali dengan optimasi metode ekstraksi tetrasiklin dari sampel. Selain itu juga dilakukan validasi metode analisis tetrasiklin dengan spektrofotometri UV-Vis yang meliputi parameter linearitas, LOD dan LOQ, presisi, serta akurasi. Pada penelitian ini telah dipelajari respon dari 2 pereaksi warna terhadap larutan baku tetrasiklin. Pereaksi formalin 37% dan asam sulfat 98% dapat mendeteksi larutan tetrasiklin sampai konsentrasi terkecil yaitu 500 ppm. Pada penelitian ini juga dilakukan perbandingan metode ekstraksi *Buffer McIlvaine* pH 4-NaEDTA dan *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol. Diperoleh bahwa metode ekstraksi *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol yang efisien digunakan untuk mengekstraksi tetrasiklin dalam sampel daging ayam, yang hasil ekstraksinya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Metode pengukuran tetrasiklin menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis telah divalidasi, sehingga diperoleh nilai: LOD 0,9982 ppm; LOQ 3,3275 ppm; %RSD 1,01% dan 1,36%; serta nilai *recovery* sebesar 100,66 %.

Kata kunci: Buffer McIlvaine, ekstraksi, spektrofotometri, tetrasiklin, uji warna

ABSTRACT

Qualitative analysis with color tests is a preliminary method that can be used to determine the presence of a substance. The sensitivity of each reagent can be different to a substance. Quantitative test of tetracycline in a sample using the UV-Vis spectrophotometry requires the most optimal extraction method, that it can give a good result. This study aimed to find the reagent detection limit and optimized the method of extracting tetracycline from the sample. The validation of tetracycline analysis method with UV-Vis spectrophotometry was also carried out, which included the parameters of linearity, LOD, LOQ, precision, and recovery. In this study, the responses of 2 reagents were studied for tetracycline analysis. Formaldehyde 37%, and sulfuric acid 98% could detect tetracycline solutions up to the smallest concentration of 500 ppm. In this study also conducted a comparison of the extraction methods of Buffer McIlvaine pH 4-NaEDTA and Buffer McIlvaine pH 4-methanol. It was found that the efficient extraction method of Buffer McIlvaine pH 4-methanol was used to extract tetracyclines in chicken meat, which extraction results were measured by a UV-Vis spectrophotometer. The measurement method of tetracycline using UV-Vis spectrophotometric has been validated, to obtain the following values: LOD 0.9982 ppm; LOQ 3.3275 ppm; %RSD 1.01% and 1.36%; and the recovery value of 100.66 %.

Keywords: Buffer McIlvaine, extraction, spectrophotometry, tetracycline, color test

PENDAHULUAN

Tetrasiklin ditemukan pada tahun 1940-an, merupakan obat antibiotik yang menghambat sintesis protein dengan mencegah perlekatan aminoasil-tRNA ke akseptor ribosom. Tetrasiklin adalah antibiotik bakteriostatik berspektrum luas, dengan menekan reproduksi banyak bakteri gram positif dan gram negatif, seperti klamidia, mikoplasma, riketsia dan parasit protozoa. Karena tetrasiklin dapat bekerja aktif sebagai antimikroba dan tidak menimbulkan efek samping yang besar, sehingga penggunaannya yang luas, baik pada terapi infeksi pada manusia dan hewan [1]. Meskipun demikian, kemunculan resistensi mikroba telah membatasi efektivitasnya. Dengan meningkatnya kejadian resistensi bakteri terhadap tetrasiklin, menghasilkan upaya studi lebih dalam terhadap penetapan analisis kualitatif dan kuantitatif tetrasiklin.

Dalam bidang kimia, analisis kualitatif adalah penentuan komposisi kimia sampel. Ini mencakup satu set teknik kimia analitis yang memberikan informasi non-numerik tentang spesimen. Analisis kualitatif dapat memberi tahu keberadaan atom, ion, kelompok fungsional, atau senyawa, hadir atau tidak ada dalam sampel, tetapi tidak memberikan informasi tentang kuantitasnya. Analisis kualitatif biasanya mengukur perubahan warna, titik leleh, bau, reaktivitas, radioaktivitas, titik didih, dan produksi gelembung. Sedangkan kuantifikasi sampel atau analisis kuantitatif adalah mengacu kepada pengukuran jumlah/kadar komponen tertentu dalam sampel. Kuantitas dapat dinyatakan dalam massa, konsentrasi, atau kelimpahan relatif dari satu atau beberapa komponen dalam sampel [2].

Analisis kualitatif terhadap tetrasiklin dapat dilakukan dengan pereaksi warna, sebagai contoh sampel yang positif mengandung tetrasiklin akan berubah warna menjadi warna hijau kuning atau kuning cokelat jika ditambahkan formalin dan berubah menjadi warna violet jika ditambahkan asam sulfat pekat. Untuk analisis kualitatif pada spektrum ultraviolet dapat dilihat dari serapan maksimum, profil/bentuk spektrumnya dan dibandingkan dengan baku/pustaka, tetrasiklin merupakan senyawa yang memiliki panjang gelombang maksimum (serapan tertinggi) pada 270 nm dengan pelarut asam encer [3].

Analisis kadar tetrasiklin dan derivatnya oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) (2009) ditetapkan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang menggunakan fase gerak berupa asetonitril: asam oksalat 0,02 M: metanol (fraksi volume 15%: 80%: 5%) [4]. Metode ini membutuhkan waktu yang lama, mahal, serta tidak cocok untuk analisis secara rutin. Terdapat metode yang lebih sederhana, lebih murah, tidak membutuhkan zat kimia untuk fase gerak, dan memiliki kepekaan yang tinggi, yaitu spektrofotometri UV-Vis [5,6]. Untuk menjamin keakuratan, kespesifikan, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis, maka metode analisis tetrasiklin dengan spektrofotometri UV-Vis perlu dilakukan validasi. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis [7].

Sebelum melakukan pengukuran kadar tetrasiklin, terlebih dahulu dilakukan ekstraksi tetrasiklin dari sampel. Tujuan dari ekstraksi ini adalah memisahkan tetrasiklin dari sampel dengan menggunakan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Secara garis besar, proses pemisahan secara ekstraksi terdiri dari tiga langkah dasar yaitu: penambahan sejumlah massa pelarut untuk dikontakkan dengan sampel, biasanya melalui proses difusi; zat terlarut akan terpisah dari sampel dan larut oleh pelarut membentuk fase ekstrak; dan pemisahan fase ekstrak dengan sampel [8]. Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi metode ekstraksi tetrasiklin dengan 2 metode yaitu ekstraksi *Buffer McIlvaine* pH 4 - NaEDTA dan *Buffer McIlvaine* pH 4 - metanol. Prosedur ekstraksi tetrasiklin dengan *Buffer McIlvaine* pH 4 - NaEDTA diadopsi dari SNI (2009) [4] dan metode ekstraksi tetrasiklin dengan *Buffer McIlvaine* pH 4 - metanol berdasarkan penelitian Boes [9].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan pengembangan metode analisis kualitatif tetrasiklin dengan pereaksi warna dengan mencari batas deteksi suatu pereaksi warna terhadap tetrasiklin, dan analisis kuantitatif yang diawali dengan optimasi metode ekstraksi tetrasiklin dari sampel. Selain itu juga dilakukan validasi metode analisis tetrasiklin dengan spektrofotometri UV-Vis yang meliputi parameter linearitas, LOD dan LOQ, presisi, serta *recovery*.

Validasi ini dilakukan karena sebelumnya belum ada penelitian yang menggunakan *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol untuk mengekstraksi tetrasiklin dan menganalisisnya dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan riset laboratorium yang dilaksanakan di Lab. Teknologi dan Sains Sekolah Tinggi Farmasi Mahaganesha, dengan menggunakan alat dan bahan sebagai berikut:

Bahan: pereaksi Benedict, Marquis, Lieberman-Burchard, asam sulfat 98% dan formalin 37%, asam klorida 37%, asam sitrat, dinatrium hidrogen fosfat, serbuk tetrasiklin HCl baku, metanol, Na-EDTA, dan akuades.

Alat: batang pengaduk, botol semprot, gelas kimia (Iwaki), gelas ukur (Herma), kaca arloji, labu ukur (Iwaki), neraca analitik (Ohaus), pipet tetes, pipet ukur (Herma), spatel, spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), sentrifugator (PLC Series), tabung reaksi, magnetic stirrer, ball filler, pH meter, Kertas Whatman No. 1.

Metode

Persiapan awal dalam penelitian ini adalah pembuatan larutan, yaitu larutan baku tetrasiklin 5000 ppm dibuat dengan melarutkan 500 g serbuk baku tetrasiklin HCl dengan larutan HCl 0,1 N dalam labu 100 mL. Selanjutnya larutan tersebut diencerkan menjadi larutan tetrasiklin dengan variasi konsentrasi. Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat dengan melarutkan asam sitrat sebanyak 4,8 gram dengan aquadest dalam labu ukur 250 mL. Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dibuat dengan melarutkan dinatrium hidrogen pospat anhidrat sebanyak 2,84 g dengan aquadest dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya larutan *Buffer McIlvaine* pH 4 dibuat dengan mencampurkan 96,4 mL larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dengan larutan asam sitrat 0,1 M sedikit demi sedikit mencapai pH 4 [4]. Selanjutnya dilakukan analisis kualitatif, validasi metode, serta uji kuantitatif tetrasiklin pada sampel.

Analisis kualitatif dengan pereaksi warna

Sebanyak 1 mL larutan baku tetrasiklin HCl berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Selanjutnya ditambahkan masing-masing 5 tetes pereaksi

formalin ke dalam tabung reaksi tersebut. Perubahan warna yang dihasilkan diamati. Tahap tersebut diulangi untuk asam sulfat 98% [3].

Validasi metode pengukuran, optimasi metode ekstraksi, dan analisis kuantitatif

Pengukuran serapan baku tetrasiklin menggunakan spektrofotometer UV-Vis divalidasi, yang meliputi: pengukuran linearitas, LOD, LOQ, presisi, serta *recovery* [10].

Optimasi metode ekstraksi tetrasiklin dalam sampel disimulasikan dengan menambahkan baku tetrasiklin HCl ke dalam daging ayam yang telah dihaluskan. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode *Buffer McIlvaine* pH 4-NaEDTA dan *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol untuk mendapatkan supernatan tetrasiklin HCl yang kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis.

Prosedur pada metode ekstraksi *Buffer McIlvaine* pH 4-NaEDTA berdasarkan pada dari SNI (2009) yang dilakukan dengan langkah berikut: serbuk Na-EDTA sebanyak 3,18 g ditambahkan ke dalam 100 mL *Buffer McIlvaine* (buffer sitrat pH 4). Daging ayam yang sudah dihaluskan ditimbang sebanyak 2 gram. Serbuk baku tetrasiklin HCl ditambahkan sebanyak 10 mg ke sampel daging ayam, diaduk, dan didiamkan 15 menit. Sampel daging ayam ditambahkan 10 mL *Buffer McIlvaine* pH 4 – Na-EDTA dan dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit. Selanjutnya sampel daging ayam disentrifugasi sebanyak 2 kali, yaitu pertama sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit dan supernatan diambil (A). Kemudian prosesi ini diulangi sebanyak satu kali (B). Supernatan (A) dan supernatan (B) dikumpulkan dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh disaring dengan kertas saring whatman No. 1 dan filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL ditambahkan dengan HCl 0,1 N sampai tanda batas. Sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum tetrasiklin yaitu pada 270 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis [4].

Metode ekstraksi *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol yang berdasarkan pada penelitian Boes (1993) yang dilakukan dengan langkah berikut: sampel yang digunakan adalah 2 g daging ayam yang sudah dihaluskan dan dicampur dengan

tetrasiklin HCl sebanyak 10 mg, diaduk, dan didiamkan 15 menit. Selanjutnya ke dalam sampel tersebut ditambahkan 5 mL metanol mL dan dihomogenkan dengan menggunakan

Selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi dengan perlakuan yang sama dengan di atas. Sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum tetrasiklin, pada 270 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis [9].

Dari kedua metode ini dilakukan perbandingan hasil absorbansi yang diperoleh pada panjang gelombang maksimum tetrasiklin HCl dengan spektrofotometri UV-Vis. Metode ekstraksi yang memberikan hasil optimal digunakan untuk uji kuantitatif. Sebanyak 2,5 mg baku tetrasiklin dicampurkan dalam 0,5 g sampel daging ayam, diaduk rata. Selanjutnya sampel diekstraksi menggunakan metode ekstraksi optimal, supernatan yang diperoleh dari hasil ekstraksi dilarutkan dengan HCl 0,1 N sampai 50 mL (diperoleh konsentrasi awal 50 ppm), kemudian dipipet sebanyak 1 mL larutan

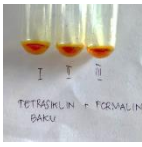

magnetic stirrer selama 10 menit. Dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan 10 ml Buffer *McIlvaine* pH 4.

tersebut dan dilarutkan dengan HCl 0,1 N sampai 10 mL (faktor pengenceran 10x), selanjutnya larutan ini diukur serapannya pada panjang gelombang 270 nm, data yang diperoleh digunakan untuk mendapatkan nilai *recovery*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis kualitatif terhadap larutan baku tetrasiklin menggunakan pereaksi warna: formalin 37% dan asam sulfat 98% menghasilkan reaksi positif seperti terlihat pada Tabel 1. Selanjutnya kedua pereaksi warna tersebut digunakan untuk menguji batas deteksi atau sensitivitas pereaksi warna terhadap larutan baku tetrasiklin dengan berbagai konsentrasi seperti hasil pengamatan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil pengamatan analisis kualitatif serbuk baku tetrasiklin HCl

Pereaksi	Hasil kriteria positif Pustaka*	Hasil pengamatan	
		Warna	Gambar hasil
Formalin 37%	Hijau kuning atau kuning cokelat	Kuning cokelat (+)	
Asam sulfat pekat 98%	Violet	Violet (+)	

Keterangan: (+) hasil pengamatan sesuai dengan pustaka; (-) hasil pengamatan tidak sesuai dengan pustaka; * (Moffat, Osselton & Widdop, 2011)

Tabel 2. Hasil Hasil uji kualitatif larutan baku tetrasiklin dengan pereaksi warna

Konsentrasi tetrasiklin (ppm)	Pereaksi warna	
	1	2
5000	+	+
4000	+	+
3000	+	+
2000	+	+
1000	+	+
500	+	+
100	-	-
50	-	-

Keterangan: 1 = pereaksi formalin 37%; 2 = pereaksi asam sulfat 98%; + hasil positif (masih dapat dideteksi pada konsentrasi tersebut); - hasil negatif (tidak dapat dideteksi)

Data pada Tabel 2 menunjukkan hasil pengujian larutan baku tetrasiklin dengan berbagai konsentrasi, hasil positif (masih dapat dideteksi) ditandai adanya perubahan warna sesuai data pada Tabel 1, jika pereaksi formalin 37% masih dapat mendeteksi keberadaan tetrasiklin HCl akan memberikan perubahan warna menjadi kuning cokelat, sedangkan pereaksi asam sulfat pekat ditandai terjadi warna violet. Jika pereaksi warna tidak mengalami perubahan saat kontak dengan larutan uji, dinyatakan pereaksi tersebut tidak dapat mendeteksi keberadaan tetrasiklin pada konsentrasi tersebut. Pada penelitian ini pereaksi formalin dan asam sulfat dapat mendeteksi tetrasiklin HCl dalam bentuk larutan baku sampai konsentrasi 500 ppm, dan semakin kecil

konsentrasi larutan, hasil uji menjadi negatif. Berdasarkan penelitian Pratiwi dkk., (2019) dan Furi & Harahap (2015) melaporkan bahwa semakin pekat warna yang dihasilkan maka semakin besar konsentrasi yang sesuai dengan hasil uji kualitatif warna larutan baku tetrasiklin HCl pada penelitian ini [11,12].

Berikut pada Tabel 3 disajikan data validasi metode pengukuran tetrasiklin menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada parameter linearitas. Selanjutnya data yang diperoleh diplot antara absorbansi dan deret konsentrasi baku tetrasiklin menghasilkan grafik yang menghasilkan persamaan regresi linear yaitu $y = 0,0343x - 0,0323$, dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 3. Data uji linearitas

Konsentrasi baku tetrasiklin (ppm)	Absorbansi
1	0,005
2	0,034
6	0,182
8	0,224
10	0,321

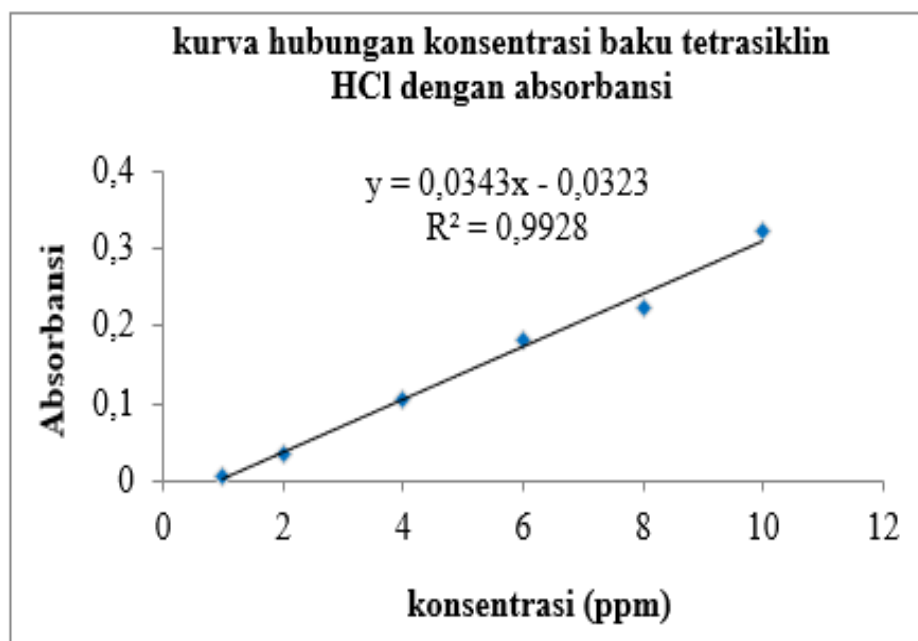
Dalam suatu penelitian eksperimen, metode analisis harus dipastikan kebenarannya untuk mendapatkan data yang valid atau dipertanggungjawabkan kebenarannya dengan melakukan validasi metode. Validasi metode adalah tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium,

untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Parameter validasi metode analisis yang dilakukan pada penelitian ini yaitu linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantisasi (LOQ), presisi, dan *recovery*. Tujuan dari uji linearitas yaitu membuktikan adanya hubungan linear

konsentrasi analit dengan respon alat. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ [10]. Aturan umum, nilai $0,90 < r < 0,95$ menunjukkan kurva yang cukup baik, nilai $0,95 < r < 0,99$ menunjukkan kurva yang baik dan nilai $r > 0,99$ menunjukkan linearitas yang sangat baik [13]. Pada penelitian ini, koefisien korelasi (r) 0,996 dan persamaan regresi linear $y = 0,0343x - 0,0323$, menunjukkan hasil linearitas yang sangat baik karena nilai r mendekati 1 dan nilai $r > 0,99$, seperti pada Gambar 1, yang menyajikan kurva

hubungan konsentrasi larutan baku tetrasiklin dengan absorbansi. Selanjutnya melalui persamaan garis linier dari kurva baku $y = 0,0343x - 0,0323$ dapat dihitung nilai LOD dan LOQ. Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi (LOD) sebesar 0,9982 ppm, sedangkan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 3,3275 ppm.

Menurut Lestari *dkk.*, (2011), menyatakan bahwa apabila dilakukan pengukuran absorbansi pada batas LOD dan LOQ atau lebih maka sampel dapat terdeteksi dan masih memberikan kecermatan dalam analisis [14].



Gambar 1. Kurva linearitas

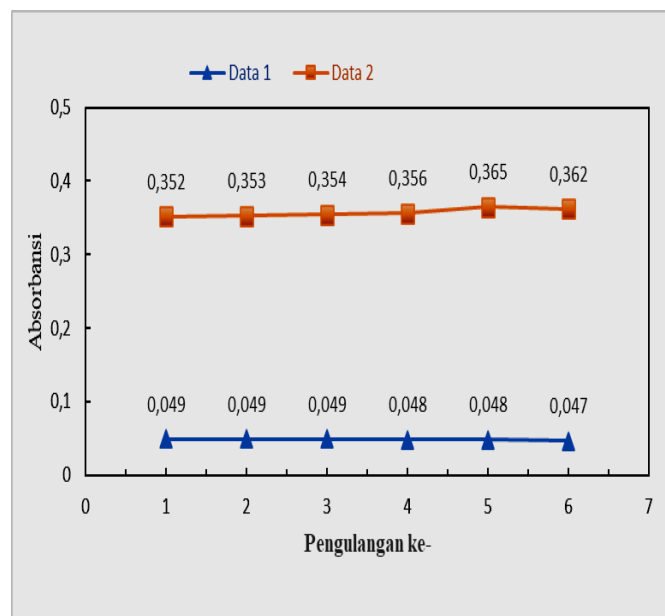
Validasi metode pada uji presisi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan parameter yang menunjukkan bahwa hasil yang didapat dalam pengukuran tidak memiliki perbedaan yang jauh dari hasil sebenarnya [13]. Pada penelitian ini, uji presisi dilakukan dengan pengukuran absorbansi baku tetrasiklin pada konsentrasi 1 ppm dan 10 ppm dengan masing-masing pengulangan 6 kali.

Dari hasil perhitungan diperoleh, nilai % *Relative Standard Deviation* (RSD) pada pengukuran tetrasiklin 1 ppm dan 10 ppm berturut-turut yaitu sebesar 1,01% dan 1,36%, sehingga uji presisi pengukuran baku tetrasiklin HCl dengan metode spektrofotometri UV-Vis telah memenuhi persyaratan atau kriteria yaitu nilai % RSD kurang dari 2% [10]. Pada Tabel 4 dan Gambar 2 ditunjukkan data serta grafik uji presisi pengukuran tetrasiklin dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

Tabel 4. Data absorbasi uji presisi

No.	Data 1		Data 2	
	Abs.	Kons*	Abs.	Kons*
1.	0,049	2,3697	0,352	11,1976
2.	0,049	2,3697	0,353	11,2267
3.	0,049	2,3697	0,354	11,2558
4.	0,048	2,3406	0,356	11,3141
5.	0,048	2,3406	0,365	11,5763
6.	0,047	2,3115	0,362	11,4889
Rata-rata		2,3503		11,3432
SD		0,0238		0,1542
%RSD		1,0121		1,3591

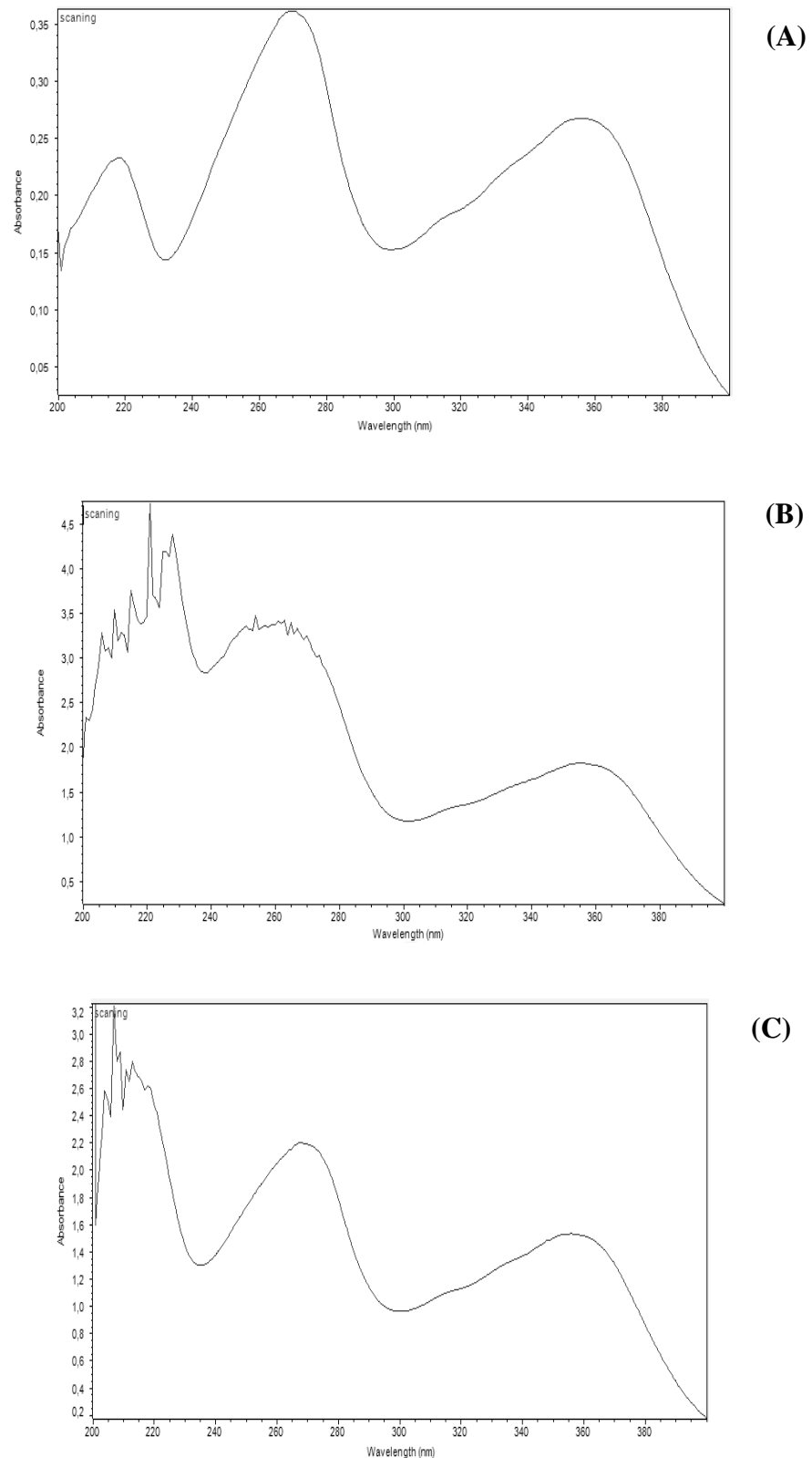
Keterangan: Data 1 adalah uji presisi menggunakan baku tetrasiklin 1 ppm; Data 2 adalah uji presisi menggunakan baku tetrasiklin 10 ppm; Abs: absorbansi; *kons: konsentrasi yang diperoleh dengan memasukkan absorbansi ke persamaan $y = 0,0343x - 0,0323$



Gambar 2. Hubungan pengulangan dengan hasil absorbansi yang diperoleh pada data presisi

Sebelum melakukan uji kuantitatif tetrasiklin dalam sampel, terlebih dahulu dilakukan optimasi metode ekstraksi. Sejumlah tertentu serbuk baku tetrasiklin HCl

dicampurkan ke dalam daging ayam yang telah dihaluskan. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode *Buffer McIlvaine* pH 4-NaEDTA dan *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol.



Gambar 3. Spektrum pengukuran di panjang gelombang 270 nm pada optimasi metode ekstraksi, (A) baku tetrasiklin tanpa ekstraksi; (B) baku tetrasiklin yang ditambahkan pada sampel yang diekstraksi dengan *Buffer McIlvaine* pH 4-NaEDTA dan (C) yang di ekstraksi dengan *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol; blanko pengukuran adalah larutan HCl 0,1 N

Pada Gambar 3 menunjukkan spektrum serapan tetrasiklin hasil ekstraksi, terlihat gambar (B) menunjukkan profil/bentuk spektrum sedikit berbeda jika dibandingkan dengan spektrum baku tetrasiklin gambar (A). Hal ini kemungkinan ada serapan dari reagen yang ikut terukur, walaupun pada panjang gelombang 270 nm memperlihatkan serapan, namun serapan yang terukur kurang halus. Sedangkan gambar (C) menunjukkan spektrum hasil ekstraksi tetrasiklin dengan metode *Buffer McIlvaine* pH 4 - metanol yang terlihat lebih baik dan sesuai dengan spektrum tetrasiklin baku (gambar 3 A), sehingga terlihat bahwa ekstraksi tetrasiklin dengan metode *Buffer McIlvaine* pH 4 - metanol memberikan hasil yang lebih optimal.

Penggunaan *Buffer McIlvaine* pH 4 yang terdiri dari 0,1 M asam sitrat dan 0,2 M dinatrium hidrogen fosfat berfungsi untuk denaturasi protein karena tetrasiklin mampu berikatan dengan protein membentuk konjugat sehingga sukar diekstraksi dari matriks sampel, dengan adanya *buffer* dapat mengekstraksi tetrasiklin dari massa daging ayam dan digunakan pelarut yang sedikit asam untuk mempercepat proses pemisahan protein (deproteinasi) serta membebaskan tetrasiklin yang terikat nonkovalen dengan makromolekul tersebut, *buffer* juga digunakan untuk menjaga kestabilan senyawa tetrasiklin pada sampel

[15,16]. Nilai pH *buffer* berpengaruh pada matriks sampel terhadap keberhasilan ekstraksi tetrasiklin, nilai pH *buffer* yang optimum untuk ekstraksi tetrasiklin yaitu 3,5 sampai 4,0. Interaksi pertukaran ion dari obat yang diprotonasi mampu meningkat dalam lingkungan asam sehingga dapat meningkatkan efikasi ekstraksi dari sampel [17]. Sedangkan peran metanol saat ekstraksi adalah sebagai pelarut organik dan berfungsi dalam perubahan struktur serta komposisi protein (denaturasi) dalam sampel daging ayam [18]. Metanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik baik polar maupun non polar. Hal ini disebabkan metanol memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH₃) [19].

Pengukuran kadar tetrasiklin dalam sampel disimulasikan dengan menambahkan 2,5 mg baku tetrasiklin dicampurkan dalam 0,5 g sampel daging ayam, diaduk rata. Selanjutnya sampel diekstraksi menggunakan metode ekstraksi *Buffer McIlvaine* pH 4 - metanol, supernatan yang diperoleh dari hasil ekstraksi dilarutkan dengan HCl 0,1 N dan diencerkan sampai 10 kali, selanjutnya larutan ini diukur serapannya pada panjang gelombang 270 nm, data yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5 di bawah ini.

Tabel 5. Data uji kuantitatif

	Absorbansi pada replikasi ke-		
	1	2	3
	0,088	0,198	0,135
Tetrasiklin dalam sampel (%)*	70,146	134,286	97,551
Rata-rata recovery	100,66%		

Keterangan: *absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke persamaan $y = 0,0343x - 0,0323$ untuk mendapatkan konsentrasi tetrasiklin dalam sampel; konsentrasi awal tetrasiklin 50 ppm dan faktor pengenceran 10x

Nilai *recovery* atau persen perolehan kembali menunjukkan kemampuan metode untuk memberikan ketepatan pengukuran terhadap analit berdasarkan angka perolehan kembali [20]. Persen perolehan kembali diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan spiking pada suatu sampel. Hasil pengamatan menunjukkan nilai *recovery* sebesar 100,66%.

Berdasarkan penelitian ini dan penelitian Christina (2011) yang menghasilkan nilai *recovery* mendekati 100%, disimpulkan kedua

Namun dalam suatu penelitian, efisiensi biaya sangat diperlukan sehingga tentunya sangat penting mempertimbangkan metode ekstraksi yang lebih murah dan bila dibandingkan antara 2 metode ekstraksi ini,

SIMPULAN

Metode analisis kualitatif dengan pereaksi warna diujikan pada larutan baku tetrasiklin. Batas deteksi tiap pereaksi dipengaruhi oleh konsentrasi larutan uji, semakin kecil konsentrasi larutan uji, sensitivitas pereaksi

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260.
- [2] Helmenstine, A. M. (2020). Definition of Qualitative Analysis in Chemistry. *ThoughtCo*, Aug. 25, 2020. <https://thoughtco.com/definition-of-qualitative-analysis-604626>
- [3] Moffat, A.C., M David, O., dan Brian, W. 2011. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Fourth edition. Pharmaceutical Press. USA.
- [4] Standar Nasional Indonesia (SNI). (2009). Cara uji kimia-Bagian 11: Penentuan residu tetrasiklin dan derivatnya dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan. *SNI 2354.11:2009*. <http://www.bkipm.kkp.go.id/bkipmnew/public/files/sni/SNI%202354.11-2009.pdf>
- [5] Rufino, J. L., Fernandes, F. C. B., Ruy, M. S., Pezza, H. R., & Pezza, L. (2010). A Simple Spectrophotometric Method for The Determination of Tetracycline and Doxycycline in Pharmaceutical Formulation Using Chloramine-T. *ECLÉTICA química São Paulo*, 35(4), 139-146.
- [6] Ali, F. & Kamoon, R. A. (2016). Spectrophotometric Determination of Tetracycline Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations Using Rhodium (II) as A Mediator Metal. *International Journal of Research Pharmacy and Chemist*, 6(2), 249-261.
- [7] Gandjar, I.G. & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan Pertama. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- [8] Wilson, I. D. (2000). *Encyclopedia of Separation Science*. Academic-Press. New York.
- [9] Boes, E., Kantasubrata, J. & Karossi, A. T. (1993). Penggunaan Ekstraksi Fasa

Pada penelitian Christina (2011) yang menggunakan *Buffer McIlvaine* pH 4-NaEDTA untuk mengekstraksi tetrasiklin pada daging ayam diperoleh %*recovery* 103,82% dan RSD 0,6143% [21], sehingga pada penelitian ini lebih difokuskan untuk validasi metode analisis tetrasiklin menggunakan *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol sebagai pengekstrak tetrasiklin, dimana validasi metode ini belum pernah dilakukan.

metode ekstraksi dapat digunakan karena memenuhi persyaratan metode analisis.

metode ekstraksi menggunakan *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol jauh lebih efisien dibandingkan dengan *Buffer McIlvaine* pH 4-NaEDTA.

semakin rendah. Metode ekstraksi tetrasiklin pada daging ayam yang efisien dapat dilakukan dengan metode *Buffer McIlvaine* pH 4-metanol, serta uji kuantitatif tetrasiklin menggunakan spektrofotometer UV-Vis memberikan hasil yang valid.

- Padat Untuk Analisis Tetrasiklin Dalam Contol Udang. *JKTI*, 3(2), 74-78.
- [10] Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian FMIPA-UI*, 1(3), 117–135.
- [11] Pratiwi, D., Wardaniati, I., & Dewi, A. P. (2019). Uji Selektifitas dan Sensitifitas Pereaksi untuk Deteksi Formalin pada Bahan Pangan. *Pharm. Jurnal Farmasi Indonesia*, 16(1), 17-26.
- [12] Furi, M. & Harahap, S. H. (2015). Analisis Kualitatif Formaldehid Pada Ikan Asin Yang Dijual di Pasar Bawah Kota Pekanbaru. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 4(2), 44-49.
- [13] Romsiah, R., Marista, S. L., & Fatoni, A. (2017). Validasi Metode dan Penetapan Kadar Nitrit (NO₂) pada Sosis Sapi Curah dan Sosis Sapi Kaleng yang dijual di Swalayan Kota Palembang secara Spektrofotometri Uv-Vis. *SCIENTIA Jurnal Farmasi dan Kesehatan*, 7(2), 113-119.
- [14] Lestari, P., Sabikis., & Utami, P. I. (2011). Analisis Natrium Nitrit Secara Spektrofotometri Visibel dalam Daging Burger yang Beredar di Swalayan Purwokerto. *Pharmacy*, 8(3), 88-98.
- [15] 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.
- [16] Damarani, A., Kurniaty, N & Herawati, D. (2015). Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Residu Tetrasiklin dalam Telur Ayam Organik dan Non Organik Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Prosiding KNMSA Universitas Islam Bandung*, 33-35.
- [17] Shama, S. A., Sharkawy, A. S. E., Mahmoud, A. H., Hassan, H. M. & Nassar, S. H. (2016). Validation of Modified HPLC Method For Determination of Oxytetracycline, Tetracycline And Doxycycline In Chicken Meat And Liver. *New York Science Journal*, 9(5), 68-74.
- [18] Yanti, S., S. Hadi., dan L. Kurniawati. 2016. Analisis Kadar Residu Antibiotik Dalam Daging Ayam Potong Yang Beredar Di Kota Mataram. *Jurnal Tambora* 1(2) : 50-56.
- [19] Sayuti, M. 2017. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi, Bagian dan Jenis Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktifitas Antioksidan Bambu Laut. *Technology Science and Engineering Journal*, 1(3), 166-174.
- [20] Rahayu, W.S., Utami, P. I., & Fajar, S. I. (2009). Penetapan Kadar Tablet Ranitidin Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis Dengan Pelarut Metanol. *Pharmacy*, 6(3), 104-125.
- [21] Christina. 2011. Penetapan Kadar Residu Tetrasiklin Dalam Daging Ayam Pedaging Secara Adisi Standar Dengan Spektrofotometri Ultraviolet. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Medan