

Prosiding

Seminar Nasional

Teknologi Peternakan dan Veteriner

"Teknologi Peternakan dan Veteriner Ramah Lingkungan dalam Mendukung Program Swasembada Daging dan Peningkatan Ketahanan Pangan"

Bogor, 3 – 4 Agustus 2010

Penyunting : L. Hardi Prasetyo
Lily Natalia
Sofjan Iskandar
Wisri Puastuti
Tati Herawati
Nurhayati
Anneke Anggraeni
Rini Damayanti
N.L.P. Indi Darmayanti
Sarwitri Endah Estuningsih

Penyunting Pelaksana : Eko Kelonowati
Muladi
Nurhasanah Hidayati
Linda Yunia

ISBN 978-602-8475-32-7

**Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Kementerian Pertanian
2011**

RESIDU TETRASIKLIN PADA DAGING AYAM PEDAGING DARI WILAYAH JAKARTA, DEPOK DAN BEKASI YANG DIDETEKSI SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

(Tetracyclines residues in broiler meat from Jakarta, Bekasi and Depok districts detected by an high performance liquid chromatography)

RAPHAELLA WIDIASTUTI, T.B. MURDIATI dan Y. ANASTASIA

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114

ABSTRACT

Tetracyclines (TCs) which included oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) dan chlortetracycline (CTC) are widely used antibiotics for therapeutic and feed additive purposes. Improper use of antibiotic could arise in the occurrence of residue in animal products can harm to human health such allergic reaction and bacterial resistant. A method for determination of tetracyclines residues in chicken meat has been established, validated and applied to study the residue level of TCs in 30 broiler chicken meats which collected from traditional markets and supermarkets in Jakarta, Bekasi dan Depok. TCs were extracted from chicken meat with McIlvaine-EDTA buffer solution and were cleaned-up with SPE C₁₈ column cartridge and identified by an HPLC with photo diode array (PDA) detector. The analysis results showed that 14 samples were positives for OTC, 2 for TC and 29 for CTC. However, the total concentration residue of TCs were still below the regulated maximum residue level (MRL) of 100 ng/g, therefore were safe for human consumption.

Key Words: Residue, Tetracyclines, Chicken Meat, HPLC

ABSTRAK

Tetrasiklin (TCs) yang meliputi oksitetrasiklin (OTC), tetrasiklin (TC) dan klortetrasiklin (CTC) merupakan golongan antibiotika yang banyak digunakan dalam dunia peternakan untuk pengobatan dan sebagai imbuhan pakan. Pemakaian antibiotik yang tidak beraturan dapat menyebabkan residu dalam jaringan organ yang dapat menyebabkan reaksi alergi, resistensi terhadap bakteri tertentu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan dan memvalidasi metoda deteksi residu tetrasiklin pada daging ayam pedaging serta mengetahui tingkat residu tetrasiklin pada 30 sampel daging ayam yang beredar di daerah Jakarta, Bekasi dan Depok. Analisis dilakukan dengan cara mengekstraksi sampel menggunakan pelarut asam trikloroasetat 20% dan larutan penyangga McIlvaine-EDTA, kemudian di-clean-up menggunakan kolom SPE C₁₈. Selanjutnya sampel diidentifikasi dan dideteksi terhadap residu tetrasiklin secara KCKT dengan detektor *photo diode array* (PDA). Hasil analisis menunjukkan bahwa 14 diantaranya positif mengandung OTC, 2 positif TC dan 29 positif CTC. Namun kandungan total residu tetrasiklin dari semua sampel masih berada di bawah batas maksimum residu (BMR) sebesar 100 ng/g sehingga masih aman untuk dikonsumsi.

Kata Kunci: Residu, Tetrasiklin, Daging Ayam Pedaging, KCKT

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotika dalam bidang peternakan hampir tidak dapat dihindari. Hal ini dimaksudkan untuk mencegah ataupun mengatasi penyakit yang ditimbulkan oleh mikroba khususnya bakteri. Salah satunya adalah penggunaan antibiotika tetrasiklin yang terdiri atas 4 jenis utamanya yaitu

oksitetrasiklin (OTC), tetrasiklin (TC), klortetrasiklin (CTC) dan doksitetrasiklin (DTC) merupakan obat hewan yang banyak digunakan di bidang peternakan. Tetrasiklin merupakan antibiotik yang bersifat bakteriostatik dan bekerja dengan jalan menghambat sintesis protein kuman.

Tetrasiklin memiliki spektrum yang luas, artinya antibiotik ini memiliki kemampuan

melawan sejumlah bakteri patogen. Oleh karenanya tetrasiklin merupakan obat hewan yang banyak digunakan termasuk di Indonesia, karena harganya murah dan mudah diperoleh. Hal ini dapat dilihat dari terdeteksinya residu golongan TC (OTC dan CTC) pada 30 dan 70% sampel daging ayam di Jawa Barat (MURDIATI *et al.*, 1998).

Konsumsi makanan asal hewan yang diberikan antibiotik tidak dilarang asalkan berada di bawah batas maksimum residu (BMR). Oleh karenanya, CODEX (2006) menetapkan BMR untuk total residu tetrasiklin pada produk ayam adalah 200 ng/g untuk daging, 600 ng/g untuk hati, 1200 ng/g untuk ginjal dan 400 ng/g untuk telur. Di Indonesia DEWAN STANDARISASI NASIONAL (2000) menetapkan BMR untuk residu TC 100 ng/g untuk daging dan 50 ng/g untuk susu, sedangkan untuk residu CTC adalah 100 ng/g untuk daging, 10 ng/g untuk telur dan 50 ng/g untuk susu. Menurut regulasi *European Community* (EC, 1996), konsentrasi residu dihitung sebagai penjumlahan dari senyawa induk TC dan 4-epimernya dari OTC, TC and CTC.

Keberadaan residu tetrasiklin pada produk pangan asal hewan (daging ayam) perlu dimonitor. Metode deteksi yang umum digunakan untuk menganalisis residu antibiotik tetrasiklin dalam pangan hasil ternak adalah metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan dapat dideteksi menggunakan detektor fluoresen (ARNAUD dan GEORGES, 2001), UV (CINQUINA *et al.*, 2003) maupun *photodiode array* (PDA) (BISWAS *et al.*, 2007).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metoda analisis serta memvalidasinya dalam mendeteksi residu tetrasiklin (OTC, TC dan CTC) dalam daging ayam pedaging menggunakan KCKT dengan detektor PDA. Untuk selanjutnya metoda yang tervalidasi diaplikasikan untuk mengetahui tingkat residu tetrasiklin pada sampel daging ayam yang berasal dari daerah Jakarta, Bekasi dan Bogor yang dideteksi untuk dibandingkan terhadap acuan BMR di Indonesia.

MATERI DAN METODE

Sebanyak 30 sampel ayam pedaging (bagian dada dan paha) dikoleksi dari daerah

Jakarta, Bekasi dan Depok pada tahun 2008 yang berasal pasar tradisional maupun swalayan. Sampel disimpan pada suhu -20°C sebelum dianalisis. Pada saat menjelang dianalisis, sampel diletakkan di suhu ruang dan setelah daging tidak membeku, dicacah halus hingga homogen.

Validasi metode

Uji validasi yang merupakan proses evaluasi produk atau metode analisis untuk menjamin pemenuhan persyaratan suatu produk atau metode analisis adalah langkah awal yang harus dilakukan sebelum menganalisis sampel lapang. Metode tersebut divalidasi dan diukur berdasarkan parameter-parameter utama yaitu uji presisi, uji linieritas, uji perolehan kembali metoda ekstraksi batas deteksi. Setelah perlakuan uji validasi langkah berikutnya adalah aplikasi pada sampel lapang.

Metode ekstraksi dan identifikasi

Metoda ekstraksi dan deteksi diadopsi dari metoda yang dikembangkan oleh CASTELLARI dan GARCIA-REGUEIRO (2003) serta CINQUINA *et al* (2005). Sebanyak 5,0 gram daging ayam yang telah dihomogenkan ditempatkan dalam tabung sentrifus. Setelah itu ditambahkan 2 ml larutan asam trikloroasetat 20% kemudian diaduk. Ke dalam sampel ditambahkan 18 ml larutan penyangga McIlvaine-EDTA (dibuat dengan mencampur 11,8 gram asam sitrat monohidrat, 13,72 gram dinatrium hidrogenfosfat dihidrat dan 33,62 gram dinatrium EDTA yang kesemuanya dilarutkan menjadi 1 L dengan penambahan air suling), kemudian diputar pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Larutan supernatan hasil sentrifus dipisahkan dari residunya kemudian dimasukkan ke dalam kolom *solid phase extraction* (SPE) C₁₈ (Varian Assoc. Inc, USA) sebelumnya diaktifkan terlebih dahulu dengan dengan 20 ml metanol dan 20 ml air. Setelah sampel masuk ke dalam kolom SPE, kolom tersebut dicuci dengan 20 ml metanol 5%, kemudian dielusi dengan 6 ml metanol oksalat. Setelah proses ekstraksi selesai, filtrat dipindahkan dalam aliran gas nitrogen kemudian dilarutkan dengan 400 µl metanol

oksalat. Sebanyak 40 µl sampel diinjeksikan ke alat KCKT (Shimadzu seri LC 20AD, Shimadzu, Inc, Japan) yang dilengkapi dengan *photodiode array* detektor (PDA) pada panjang gelombang 355 nm dan 368 nm, kolom µ-BondapakTM C₁₈ (3,9 x 300 mm) (Waters, Millipore, USA) dan Guard-Pak µ-BondapakTM C₁₈ (10 µm, 125Å) (Waters, Millipore, USA) dengan fasa gerak campuran asam oksalat 0,0025 M - asetonitril (4:1, v/v) pada kecepatan alir 1,0 mL/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengembangan metode dan validasi metode

Ekstraksi menggunakan larutan EDTA-McIlvaine merupakan serta penggunaan SPE C₁₈ cartridge merupakan metoda standar dalam menganalisis tetrasiklin dalam daging yang dikembangkan oleh OKA *et al.* (1985). Detektor yang digunakan pada penelitian ini adalah *photodiode array* (PDA) yang dapat digunakan untuk menganalisis lebih dari 1 senyawa dengan panjang gelombang berbeda secara simultan. Hasil pemindaian (*scan*) spektrum serapan sinar UV-Vis untuk TC, OTC dan CTC menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum adalah 355,04 nm untuk OTC, 355,22 nm untuk OTC dan 368,10 nm untuk CTC sesuai dengan yang didapatkan oleh O'NEIL *et al.* (2006) karena antibiotik golongan tetrasiklin memiliki karakteristik serapan UV-Vis (CINQUINA *et al.*, 2005), sehingga pada penelitian ini panjang gelombang yang digunakan adalah 355 nm

untuk mendeteksi OTC dan TC serta 368 nm untuk mendeteksi CTC.

Hasil uji validasi yang dirangkum sebagai performa karakteristik analisis pengujian tetrasiklin dengan KCKT yang meliputi uji presisi, uji linearitas, uji perolehan kembali pada penambahan standar OTC, TC dan CTC masing-masing sebesar 50 ppb, 100 ppb dan 150 ppb dan limit deteksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Performa karakteristik untuk mendeteksi tetrasiklin berupa uji presisi dengan kisaran 0,73 hingga 0,97% yang berarti $\leq 2,00\%$, uji linearitas dengan kisaran 0,9993 hingga 0,9997 yang mendekati 1, dan uji perolehan kembali dalam kisaran rata-rata 112,46 hingga 116,06 % untuk mendeteksi OTC dan 89,53 hingga 114,31% untuk mendeteksi CTC yang berarti dalam kisaran 60 – 115% (terkecuali untuk mendeteksi TC yaitu 42,21 hingga 48,81%) menunjukkan bahwa kesemua parameter memenuhi syarat yang diharapkan sebagaimana yang ditentukan menurut AOAC (1993). Sedangkan limit deteksi untuk mendeteksi OTC adalah 5,28 ng/g, TC 5,09 ng/g dan CTC 10,52 ng/g, sehingga hasil analisis yang lebih rendah dari limit deteksi akan disimpulkan menjadi tidak terdeteksi. Rendahnya nilai uji perolehan kembali untuk TC kemungkinan karena ketidakstabilan dari senyawa ini terutama terhadap cahaya maupun pelarut metanol dan terdegradasi menjadi epimernya sebagaimana yang diungkapkan oleh LIANG *et al.* (1998), sehingga seharusnya digunakan pelarut lain untuk TC seperti asam oksalat (GAJDA dan POSYNIK, 2009).

Tabel 1. Hasil validasi metoda analisis tetrasiklin

Parameter validasi	OTC	TC	CTC
Presisi (%)	0,97	0,87	0,73
Linearitas (R ²)	0,9997	0,9995	0,9993
Limit deteksi (ng/g)	5,28	5,09	10,52
Uji perolehan kembali (%)	113,06 (50 ppb)	48,81 (50 ppb)	114,31 (50 ppb)
	116,06 (100 ppb)	48,87 (100 ppb)	108,95 (100 ppb)
	112,46 (150 ppb)	42,21 (150 ppb)	89,53 (150 ppb)

Hasil analisis residu tetrasiklin pada sampel lapang

Hasil analisis pada 30 sampel lapang yang dikumpulkan dari daerah Depok, Jakarta dan Bekasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil penelitian terhadap ketiga jenis antibiotika tetrasiklin (OTC, TC dan CTC) menunjukkan bahwa 14 (46,67%) sampel positif mengandung OTC dengan kisaran

konsentrasi 6,95 hingga 41,55 ng/g, 2 (6,67%) sampel positif TC dengan konsentrasi 13,28 dan 58,01 ng/g dan 29 (96,67%) sampel positif CTC dengan kisaran 14,72 hingga 46,76 ng/g. Namun konsentrasi residu total tetrasiklin dari semua sampel dalam kisaran 7,35 hingga 77,50 menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut masih berada di bawah BMR (100 ng/g) sehingga masih aman untuk dikonsumsi.

Tabel 2. Konsentrasi residu tetrasiklin pada sampel daging ayam sampel lapang yang dideteksi secara KCKT

Lokasi	Kode	Konsentrasi residu (ng/g)			
		OTC	TC	CTC	Total tetrasiklin
Depok	D1	41,55	tt	35,95	77,50
	D2	tt	tt	38,68	38,68
	D3	tt	tt	19,46	19,46
	D4	7,88	tt	18,09	25,97
	D5	6,95	tt	14,72	21,67
	D6	tt	tt	44,37	44,37
	D7	8,53	58,01	19,00	85,54
	D8	tt	tt	13,68	13,68
	D9	13,42	tt	26,26	39,68
	D10	8,40	tt	16,34	24,74
Jakarta	J1	5,98	14,28	18,24	38,50
	J2	tt	tt	15,55	15,55
	J3	7,35	tt	tt	7,35
	J4	22,42	tt	15,33	37,75
	J5	10,31	tt	33,24	43,55
	J6	tt	tt	16,71	16,71
	J7	tt	tt	29,45	29,45
	J8	8,69	tt	38,98	8,69
	J9	tt	tt	38,96	38,96
	J10	10,37	tt	31,07	41,44
Bekasi	B1	tt	tt	26,45	26,45
	B2	tt	tt	43,13	43,13
	B3	tt	tt	58,92	58,92
	B4	tt	tt	32,34	32,34
	B5	15,35	tt	25,70	41,05
	B6	tt	tt	37,69	37,69
	B7	12,58	tt	23,81	36,39
	B8	tt	tt	46,76	46,76
	B9	tt	tt	53,87	53,87
	B10	tt	tt	31,07	31,07

tt: tidak terdeteksi (limit deteksi OTC: 5,28 ng/g; TC: 5,09 ng/g dan CTC: 10,52 ng/g)

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun residu tetrasiklin masih terdeteksi pada daging ayam pedaging yang beredar di daerah Jakarta, Bekasi dan Depok, namun penggunaannya masih dalam batas wajar atau masih memperhatikan waktu hentinya (sekitar 21 hari, tergantung jenisnya). Waktu henti tetrasiklin yang cukup panjang disebabkan tetrasiklin mengalami sirkulasi enterohepatik yang ekstensif (PRESCOTT dan BAGGOT, 1993). Selanjutnya tetrasiklin terdistribusi secara meluas ke seluruh jaringan tubuh dan biasanya ditemukan dengan konsentrasi tinggi di organ ekskresi terutama hati dan ginjal.

Hasil penelitian ini juga mengartikan bahwa penggunaan campuran (*multiple*) antibiotika tetrasiklin hingga saat ini masih dipergunakan secara ekstensif oleh peternak. Hal serupa juga terjadi di Saudi Arabia, dimana ditemukan 87% dari sampel daging ayam pedaging yang diperiksa mengandung paling sedikit satu jenis TC (AL-GHAMDI *et al.*, 2000). OTC dan CTC digunakan di Amerika sebagai imbuhan pakan dan pengobatan untuk ternak ayam, sedangkan TC hanya digunakan untuk tujuan pengobatan. Penggunaan antibiotika golongan tetrasiklin secara meluas dan tidak sesuai dengan aturan di negara lain ditunjukkan oleh adanya laporan mengenai tingginya konsentrasi yang melebihi BMR pada telur dan daging ayam di Kenya (OMIJA *et al.*, 1994) maupun di Saudi Arabia (AL-GHAMDI *et al.*, 2000).

Penelitian yang penting untuk diperhatikan adalah mengenai stabilitas residu TC akibat proses pemasakan dimana terjadi penurunan konsentrasi residu TC dan CTC akibat proses pemasakan, namun meningkat untuk residu OTC (AL-GHAMDI *et al.*, 2000).

KESIMPULAN

Analisis residu tetrasiklin yang terdiri atas oksitetrasiklin (OTC), tetrasiklin (TC) dan klortetrasiklin (CTC) pada daging ayam pedaging dapat dilakukan dengan cara mengekstraksi sampel menggunakan pelarut asam trikloroasetat 20% dan larutan penyangga McIlvaine, kemudian di-clean-up menggunakan kolom SPE C₁₈. Selanjutnya

sampel diidentifikasi dan dideteksi terhadap residu tetrasiklin secara KCKT menggunakan detektor *photo diode array* (PDA) pada panjang gelombang 355 nm untuk mendeteksi OTC dan TC serta 368 nm untuk mendeteksi CTC.

Hasil validasi metoda uji yang meliputi uji presisi, linearitas, uji perolehan kembali menunjukkan bahwa metoda tersebut memenuhi persyaratan terkecuali untuk uji perolehan kembali TC, sehingga metoda tersebut dapat diaplikasikan untuk mendeteksi residu tetrasiklin pada sampel lapang.

Hasil analisis pada 30 sampel lapang yang dikumpulkan dari daerah Depok, Jakarta dan Bekasi pada tahun 2008 menunjukkan bahwa 14 (46,67%) sampel positif mengandung OTC dengan kisaran konsentrasi 6,95 hingga 41,55 ng/g, 2 (6,67%) sampel positif TC dengan konsentrasi 13,28 dan 58,01 ng/g dan 29 (96,67%) sampel positif CTC dengan kisaran 14,72 hingga 46,76 ng/g. Namun kandungan total residu tetrasiklin dari semua sampel dalam kisaran 7,35 hingga 77,50 menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut masih berada di bawah BMR yang ditetapkan DEWAN STANDARISASI NASIONAL (2000) sebesar 100 ng/g, sehingga masih aman untuk dikonsumsi. Hasil penelitian ini mengartikan bahwa penggunaan campuran (*multiple*) antibiotika tetrasiklin hingga saat ini masih dipergunakan secara ekstensif oleh peternak

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner beserta jajarannya dan Kepala Dinas beserta staf dari Dinas Kelautan dan Pertanian Provinsi DKI Jakarta, Dinas Perikanan dan Kelautan Kabupaten Bekasi dan Dinas Pertanian Kota Depok atas ijin dan bantuannya dalam melaksanakan pengumpulan sampel lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- AL-GHAMDI, M.S Z.H AL-MUSTAFA, F. EL-MORSY, A. AL-FAKY, I. HAIDER and H. ESSA. 2000. Residues of tetracycline compounds in poultry products in the eastern province of Saudi Arabia. *Public Health*, 114: 300 – 304.

- AOAC, 1998. AOAC Peer verified methods program, manual on policies and procedures, arlington, VA, Nov 1998. <http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf> (2 Maret 2010).
- BISWAS, A.K., G.S. RAO, N. KONDAIAH, A.S.R. ANJANEYULU, S. K. MENDIRATTA, R. PRASAD and J.K. MALIK 2007. A Simple multi-residue method for determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in export buffalo meat by HPLC-photodiode array detector. *J. Food and Drug Analysis*. 15(3): 278 – 284.
- CASTELLARI, M. and J.A. GARCIA-REGUEIRO. 2003. HPLC determination of tetracyclines in lamb muscle using an RP-C18 monolithic. *Chromatographia*. 11/12: 789 – 793.
- CINQUINA, A.L, F. LONGO, G. ANASTASI, L. GIANNETTI and R. COZZANI. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatography* 987: 227 – 233.
- CODEX 2006. MRLs for Veterinary Drugs in Foods. 26th Session of the Codex Alimentarius Commission. p. 4.
- DEWAN STANDARISASI NASIONAL. 2000. Batas maksimum cemaran mikroba dan batas maksimum residu dalam bahan makanan asal hewan. Direktorat Kesehatan Masyarakat Veteriner, Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta.
- EUROPEAN COMMUNITY. 1996. Council Regulation EC, 281/96, 1996. No. L 37/9.
- GAJDA, A. and A. POSYNIK. 2009. Tetracyclines and their epimers in animal tissues by High Performance Liquid Chromatography. *Bull Vet Inst Pulawy* 53: 263 – 267.
- LIANG, Y., M.B. DENTON and R.B. BATES. 1998. Stability studies of tetracycline in methanol solution. *J. Chromatogr A*. 827: 45 – 55.
- MURDIATI, T.B., INDRANINGSIH and S. BAHRI. 1998. Contamination at animal products by pesticides and antibiotics. *In: Seeking agricultural produce free of pesticides residues*. ACIAR Proc. No. 85. Kennedy, pp. 115 – 121.
- OKA, H., K. MATSUMOTO., K. UNO, K.I. KARADA. S. KADOWAKI and M. SUZUKI. 1985. *J. Chromatogr.* 643: 369 – 378.
- OMIJA, B., E.S. MITEMA and T.E. MAITHO. 1994. Oxytetracycline residue levels in chicken eggs of medicated drinking water to laying chickens, *Food Additives and Contaminants*. 11: 641 – 647.
- PRESCOTT J.F. and J.D. BAGGOT. 1993. Tetracyclines. *In: Prescott JF, Baggot JD (eds.), Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 2nd edn. Iowa State University Press: Iowa, 1993, pp. 215 – 228.