

IDENTIFIKASI KLORAMFENIKOL PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) MENGGUNAKAN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Maulida Juliana¹, Muammar Yulian^{1*}

¹Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Ar-Raniry

*E-mail: muammar.yb@gmail.com

Abstract: A study was conducted with the aim of identifying chloramphenicol in vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using a high performance liquid chromatography (HPLC), with a standard chloramphenicol retention time of 0.110 minutes. The level of residual chloramphenicol in vaname shrimp from pond aquaculture in Krueng Raya is 0.168 ppb and is still below the allowed detection limit.

Keywords : Kloramfenikol, vaname shrimp, HPLC.

Abstrak : Telah dilakukan penelitian dengan tujuan identifikasi kloramfenikol pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Hasil pengujian pada udang vaname dari hasil budidaya tambak di Krueng Raya, Aceh Besar diketahui terdapat senyawa kloramfenikol pada sampel tersebut yang ditandai dengan waktu retensi sampel 0,106 menit, berdekatan dengan waktu retensi standar kloramfenikol yaitu 0,110 menit. Kadar residu kloramfenikol pada udang vaname dari hasil budidaya tambak di Krueng Raya adalah sebesar 0,168 ppb dan masih berada di bawah batas deteksi yang diperbolehkan.

Kata Kunci: Kloramfenikol, udang vaname, HPLC.

PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) telah menjadi salah satu komoditas utama yang dibudidayakan saat ini. Peningkatan ekspor udang vaname membuat para pembudidaya menerapkan sistem budidaya intensif. Penerapan budidaya intensif dapat berakibat pada penurunan kualitas perairan, sehingga menimbulkan penyakit pada udang vaname yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur maupun parasit (Santi *et al.*, 2017). Pembudidaya

mengantisipasi dengan penggunaan antibiotik seperti kloramfenikol (Putra, 2016).

Kloramfenikol merupakan antibiotik berspektrum luas yang memiliki aktivitas melawan bakteri aerobik, anaerobik dan fungi. Kloramfenikol banyak digunakan karena harganya yang relatif murah. Kloramfenikol dianggap dapat menghambat timbulnya penyakit serta meningkatkan berat dari udang budidaya (Alghifari *et al.*, 2017).

Ketidaksadaran para pembudidaya dalam menggunakan anti

biotik seperti kloramfenikol ternyata menimbulkan efek negatif. Penyalahgunaan antibiotik ini dapat mengakibatkan tertinggalnya bahan kimia sebagai residu dalam daging udang yang berdampak pada gangguan kesehatan konsumennya (Salita, 2011). Residu kloramfenikol akan mengakibatkan anemia aplastik, gangguan lambung, usus, neuropati optis dan perifer, radang pada mulut dan kerusakan sumsum tulang belakang serta penyebab *grey syndrome* pada bayi (Alghifari *et al.*, 2017).

Kloramfenikol merupakan salah satu dari sembilan jenis bahan tambahan makanan yang dilarang di Indonesia berdasarkan Permenkes No. 1168/Menkes/PER/X/1999. Walaupun demikian penggunaan kloramfenikol masih banyak digunakan sehingga menghambat dan menggagalkan ekspor ke berbagai negara dunia. Puncak kegagalan ekspor terjadi saat diterapkannya *zero tolerance* kandungan kloramfenikol oleh negara Uni Eropa terhadap komoditas udang yang diimpornya sehingga pemerintah memberlakukan kewajiban uji residu kloramfenikol dengan batas deteksi 0,3 ppb (Islamulhayati *et al.*, 2005).

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan suatu metode analisis dengan teknik kromatografi dimana melibatkan fase gerak cairan dan fase diam cairan atau padatan (Aprilia, 2018). Menurut Wibowo *et al.* (2010), HPLC ialah salah satu metode analisis yang dapat mendeteksi kadar kloramfenikol dengan jumlah ppb. Pada penelitian Salita (2011), identifikasi kloramfenikol pada udang windu dari hasil budidaya tambak dilakukan dengan menggunakan HPLC dengan membandingkan waktu tambat dari sampel terhadap waktu tambat standar kloramfenikol, sehingga diperoleh hasil waktu tambat yaitu 5,91 menit yang berdekatan dengan waktu tambat pembanding kloramfenikol yaitu 5,95 menit. Sedangkan penelitian Reninta (2014) analisis senyawa kloramfenikol dalam udang menggunakan HPLC menggunakan detektor UV-Vis, dimana

hasil yang diperoleh yaitu pada waktu tambat 10 menit kadarnya 1,9648 dan 0,5745 ppm.

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan identifikasi kadar kloramfenikol pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dari hasil budidaya tambak di Krueng Raya, Kecamatan Baitussalam, Kabupaten Aceh Besar menggunakan HPLC di Unit Pelaksanaan Teknis Daerah Pengujian dan Penerapan Mutu Hasil Perikanan (UPTD PPMHP) Lampulo Banda Aceh.

METODE

Langkah-langkah pengujian dilakukan secara analisis kualitatif dan kuantitatif pada penelitian ini berdasarkan instruksi Standar Nasional Indonesia (SNI 2354.9:2009) terhadap udang vaname.

Persiapan larutan baku pembanding kloramfenikol:

Sebanyak 0,1 g larutan baku kloramfenikol dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambahkan 2 mL etanol, diaduk hingga homogen dan dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL, serta ditepatkan dengan air pro HPLC. Selanjutnya dibuat larutan baku 100 µg/mL, 10 µg/mL dan 1 µg/mL dengan mengencerkan larutan baku. Kemudian dibuat larutan baku kerja 5 ng/mL, 20 ng/mL dan 40 ng/mL dari baku 1 µg/mL.

Pembuatan fase gerak

Metanol pro HPLC dan air pro HPLC sebanyak 500 mL disaring menggunakan *Nylon Membrane Filters Whatman* 0,45 µm dengan bantuan pompa vakum. Fase gerak dibuat dengan perbandingan metanol pro HPLC dan air pro HPLC (40:60) dengan laju alir kurang lebih 1 mL.

Preparasi sampel

Sebanyak 150 g udang dihaluskan, kemudian ditimbang sampel yang sudah dihaluskan tersebut sebanyak 10 g dalam tabung reaksi 50 mL. Ditambahkan 2 mL akuabides, dikocok dengan vortex selama 1 menit dan didiamkan selama 10 menit kemudian ditambah 6 mL etil asetat, tutup

dan kocok kembali dengan vortex selama 1 menit. Sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3.500 rpm hingga terdapat 3 lapisan. Dipipet 4,2 mL lapisan paling atas, dikeringkan pada suhu 30 °C dengan mengalirkan gas nitrogen hingga tidak ada lagi etil asetat yang tersisa. Residu disuspensikan dengan 1,4 mL campuran heksana-kloroform (1:1) dan ditambah 0,7 mL air pro HPLC, divortex selama 5 menit. Sentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm selama 5 menit. Diambil supernatannya dan dimasukkan ke dalam botol vial sebanyak 1 mL. Supernatant siap diinjeksikan ke alat HPLC.

Analisis Kualitatif:

Analisis kualitatif kloramfenikol pada udang vaname dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi yang sama dari kromatogram hasil penyuntikan sampel dengan kromatogram hasil penyuntikan larutan standar kloramfenikol pada kondisi HPLC yang sama. Sampel dinyatakan mengandung kloramfenikol jika terdapat waktu retensi yang sama dengan kromatogram hasil penyuntikan standar kloramfenikol

Analisis Kuantitatif:

Pembuatan kurva kalibrasi baku pembanding kloramfenikol. Adapun kadar kloramfenikol pada sampel dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Kloramfenikol (mg/mL)} = \frac{X(\text{mg/mL}) \times \text{Volume Larutan Sampel (mL)}}{\text{Berat Sampel (g)}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan residu kloramfenikol pada udang vaname dilakukan dengan HPLC fasa terbalik. Fase terbalik adalah kolom yang fasa diamnya bersifat non polar, sedangkan fase geraknya bersifat polar (Rohman, 2009). Oleh karena itu, agar menghasilkan analisis yang baik maka terlebih dahulu ditentukan kondisi optimum HPLC yang meliputi panjang gelombang yang digunakan untuk analisis dan optimasi fase gerak yang digunakan.

Tabel 1. Data Hasil Pengamatan

Sampel	Uji Kualitatif	Uji Kuantitatif
Udang Vaname	+	0,168 ppb

HPLC yang digunakan menggunakan kolom C-18 (150 mm x 4.6 mm), 5µm atau ekuivalen. Kolom pada HPLC berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen seperti klorosilan. Reagen ini akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus fungsional yang lain. *Oktadesil silika* (ODS atau C-18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Rohman, 2009). Detektor yang digunakan yaitu UV dengan Panjang gelombang 278 nm, volume injeksi 100 µl – 400 µl. Fase gerak yang digunakan yaitu metanol pro HPLC : air pro HPLC (40:60) dengan laju alir 1 mL/menit. Setelah alat HPLC dihidupkan, maka pompa dijalankan dan fase gerak dibiarkan selama 30 menit hingga diperoleh garis alas yang datar, menandakan sistem tersebut telah stabil.

Setelah diperoleh kondisi HPLC yang optimal, maka dilakukan penanganan terhadap sampel yaitu udang vaname yang diperoleh dari di Krueng Raya, Kecamatan Baitussalam, Kabupaten Aceh Besar.

Preparasi larutan sampel diawali dengan menghaluskan udang dengan cara dicincang yang bertujuan untuk memperkecil luas penampang sampel sehingga residu kloramfenikol keluar dari jaringan sampel ketika diekstraksi. Proses ekstraksi kloramfenikol pada sampel udang dengan menambahkan larutan etil asetat. Larutan etil asetat digunakan untuk melarutkan kloramfenikol pada sampel dikarenakan etil asetat dan kloramfenikol bersifat semi polar. Kemudian dikocok dengan vortex untuk homogenisasi.

Sampel yang telah homogen disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm bertujuan untuk memisahkan larutan etil asetat dengan padatan sampel (*pellet*). Hasil sentrifugasi ini membentuk 3 lapisan yaitu lapisan etil asetat, air dan sampel udang. Supernatan etil asetat (lapisan

atas) dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Supernatan etil asetat dikeringkan pada suhu 30°C dengan mengalirkan gas nitrogen menggunakan nitrogen evaporator. Proses pengeringan menggunakan nitrogen evaporator bertujuan untuk menguapkan etil asetat, sehingga yang tersisa hanya residu kloramfenikol. Kloramfenikol tidak ikut menguap karena titik didih kloramfenikol sekitar 149-153°C (Salita, 2011).

Ekstrak kloramfenikol yang sudah kering ditambahkan campuran hexana-kloroform yang berfungsi untuk menarik lemak yang terikat pada proses ekstraksi karena lemak larut dalam pelarut non polar. Kemudian disentrifugasi sehingga terjadi pemisahan secara sempurna. Supernatan yang dihasilkan yaitu larutan tidak berwarna kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan diinjeksi ke alat HPLC.

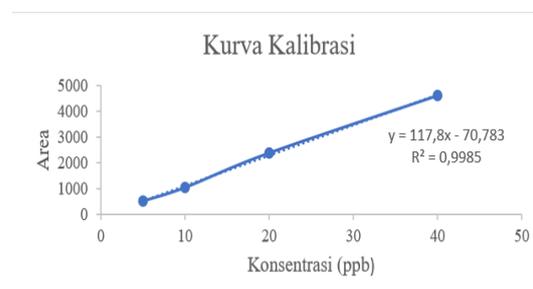
Analisis Kualitatif Kloramfenikol Pada Udang Vaname

Analisis kualitatif kloramfenikol pada udang Vaname dilakukan dengan membandingkan waktu retensi sampel terhadap waktu retensi standar kloramfenikol. Hasil uji kualitatif tersebut menunjukkan bahwa sampel udang vaname positif mengandung kloramfenikol. Dari hasil penyuntikan sampel udang vaname diperoleh waktu retensi salah satu puncak yaitu 0,106 menit. Waktu retensi ini berdekatan dengan waktu retensi standar kloramfenikol yaitu 0,110 menit. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Salita (2011) terhadap pengujian kloramfenikol dengan HPLC. Hasil uji kualitatif kloramfenikol dalam sampel udang windu dimana waktu retensi salah satu puncaknya yaitu 5,91 menit dan waktu retensi standar kloramfenikol BPFI yaitu 5,95 menit. Walaupun hasil waktu retensi pada sampel tidak sama persis namun waktu retensi 5,91 menit masih berada dalam rentang yang dapat diterima yaitu $\pm 5\%$ dari waktu retensi 5,95 menit. Penelitian Wibowo *et al.*, (2010), terdapat kloramfenikol dalam sampel ikan gurami

ditandai dengan waktu retensi sampel dan standar relatif sama yaitu pada menit ke-7,958 dan menit ke- 8,119 untuk masing-masing sampel dan standar kloramfenikol.

Analisis Kuantitatif Kloramfenikol Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Analisis secara kuantitatif ditentukan dari kurva kalibrasi kloramfenikol. Kurva kalibrasi kloramfenikol dibuat dengan konsentrasi dimulai dari 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb dan 40 ppb. Pemilihan konsentrasi ini dikarenakan kloramfenikol sensitif pada konsentrasi kecil. Kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Standar Kloramfenikol.

Dari kurva kalibrasi diperoleh hubungan yang linier antara antara luas area dan konsentrasi dengan korelasi $r^2 = 0,9985$. Koefisien korelasi merupakan nilai yang menunjukkan kuat atau tidaknya hubungan linier antar dua variable. Koefisien korelasi diperoleh mendekati 1 dan terbentuk garis lurus, maka ini telah memenuhi syarat digunakannya kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi dengan luas area kromatogram untuk pengukuran analisis. Hasil pada penelitian ini diperoleh waktu retensi 0,1 menit. Dari hasil perhitungan diperoleh persamaan regresi yaitu $Y = 117,8x - 70,783$. Selanjutnya persamaan ini dapat digunakan untuk mengukur kadar kloramfenikol pada sampel dalam satuan ppb dengan cara disubstitusikan nilai Y dengan nilai luas area sampel yaitu 127,33301.

Hasil pengolahan data penetapan kadar kloramfenikol dalam udang vaname

yang diperoleh dari budidaya tambak di Krueng Raya, Kecamatan Baitussalam, Kabupaten Aceh Besar secara HPLC menggunakan kolom C-18 (150 mm x 4,6 mm) pada kondisi yang optimal. Hasil penetapan kadar kloramfenikol yang diperoleh pada sampel udang vaname yaitu sebesar 0,168 ppb yang masih dikategorikan aman dikonsumsi oleh manusia.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini hasil pengujian udang vaname dari hasil budidaya tambak di Krueng Raya didapatkan senyawa kloramfenikol ditandai dengan waktu retensi

sampel yaitu 0,106 menit berdekatan dengan waktu retensi standar kloramfenikol yaitu 0,110 menit.

Kadar residu kloramfenikol pada udang vaname dari hasil budidaya tambak di Krueng Raya, Kecamatan Baitussalam, Kabupaten Aceh Besar adalah sebesar 0,168 ppb dan masih berada di bawah batas deteksi yang diperbolehkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Pengujian dan Penerapan Mutu Hasil Perikanan (PPMHP).

DAFTAR RUJUKAN

- Alghifari, D. (2016). Pengembangan Sensor Kloramfenikol Berbasis Imobilisasi Bovine Serum Albumin (BSA) Pada Selulosa Asetat Dengan Metode Spektrofotometri. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Alghifari, D., Kuswandi, B., & Pratoko, D. K. (2017). Pengembangan Sensor Kloramfenikol Berbasis Imobilisasi Bovine Serum Albumin (BSA) pada Selulosa Asetat dengan Metode Spektrofotometri. *Pustaka Kesehatan*, 5(1), 40–45.
- Aprilia, R. (2018). Analisis Kadar Residu Antibiotik Kloramfenikol Dalam Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Dari Budidaya Ikan Daerah Rancaekek DENGAN Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Skripsi*. Universitas Al-Ghifari.
- Islamulhayati, Keman, S., & Yudhastuti, R. (2005). Pengaruh Residu Kloramfenikol dalam Udang Windu terhadap Kejadian Anemia Aplastik pada Mencit. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, 1(2), 98–110.
- Putra, T. F. (2016). Pemeriksaan Kloramfenikol Pada Sampel Udang Vannamei Beku Di Upt. Pengendalian Dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (PPMHP), Surabaya. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Reninta, F. (2014). Analisis Residu Kloramfenikol Pada Udang Menggunakan Teknik Dispersive Liquid-Liquid Microextraction-High Performance Liquid Chromatography-UV-VIS. *Skripsi*. Universitas Airlangga.
- Rohman, A. (2009). Kromatografi Untuk Analisis Obat. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Salita, E. (2011). Pemeriksaan Residu Kloramfenikol Pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) Dari Hasil Budidaya Tambak Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Santi, Nur, I., & Kurnia, A. (2017). Penggunaan Bahan Aktif Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*

L) untuk Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Penyebab Penyakit pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Secara in Vitro. *Journal of Fishery Science and Innovation*, 1(2), 10–15.

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.