

Pengembangan Sensor Kloramfenikol Berbasis Imobilisasi Bovine Serum Albumin (BSA) pada Selulosa Asetat dengan Metode Spektrofluorometri (The Development of Chloramphenicol Sensor Based on Bovine Serum Albumin (BSA) Immobilization on Cellulose Acetate using Spectrofluorometry Method)

Dhany Alghifari, Bambang Kuswandi, Dwi Koko Pratoko
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jalan Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: dhanyalghifari@gmail.com

Abstract

The chloramphenicol usage in shrimp cultivation is an example of antibiotics abuse that have adverse effects for health. According to Indonesian Drug and Food Agency (BPOM) survey, it showed that from 14 samples of shrimp test, entirely contain residues of chloramphenicol. In this context, the sensor has been developed base on cellulose acetate membrane immobilized with bovine serum albumin (BSA). The chloramphenicol sensor has a linearity range of 2-12 $\mu\text{g/ml}$ and the r value of -0.997. The value of limit of detection is 0.157 $\mu\text{g/ml}$ and limit of quantification is 0.472 $\mu\text{g/ml}$. The RSD value of repeatability is 1.542 % and the value of intermediate precision is 1.058%. The average value of recovery as the parameter an accuracy test of $95.338 \pm 0.636\%$ and this sensor has a good selectivity tests to erythromycin, pellets and shrimp meat. The result also shown in good agreement with the conventional spectrofluorometry method

Keywords: shrimp, chloramphenicol, BSA, sensor, spectrofluorometry

Abstrak

Penggunaan kloramfenikol pada budidaya udang merupakan suatu bentuk penyalahgunaan yang memiliki dampak merugikan bagi kesehatan. Berdasarkan hasil survei BPOM menunjukkan bahwa dari 14 sampel udang uji, seluruhnya mengandung residu kloramfenikol. Dalam konteks ini, sensor ini dikembangkan dengan dengan selulosa asetat yang terimobilisasi dengan bovine serum albumin (BSA). Sensor kloramfenikol memiliki rentang linieritas dari 2-12 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai r sebesar -0,997. Nilai batas deteksi sebesar 0,157 $\mu\text{g/ml}$ dan batas kuantifikasi sebesar 0,472 $\mu\text{g/ml}$. Presisi dengan rata-rata nilai RSD keterulangan 1,542% dan nilai RSD presisi intermediet sebesar 1,058%. Nilai *recovery* sebagai parameter akurasi sebesar $95,338 \pm 0,636\%$ dan memiliki selektivitas yang baik terhadap eritromisin, pelet dan daging udang. Hasil ini juga sesuai dengan metode spektrofotometri konvensional yang digunakan sebagai pembandingan.

Kata kunci: udang, kloramfenikol, BSA, sensor, spektrofotometri

Pendahuluan

Tingginya angka penggunaan antibiotik pada usaha budidaya udang windu (*Panaeus monodon*) kini mulai meresahkan pemerintah dan masyarakat. Beberapa antibiotik yang sering digunakan dalam usaha budidaya udang

antara lain kloramfenikol, eritromisin dan tetrasiklin. Hasil uji laboratorium yang dilakukan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) menunjukkan bahwa dari 14 sampel udang hasil produksi dari beberapa tambak di Indonesia, seluruhnya positif mengandung

residu kloramfenikol [1]. Penggunaan antibiotik dilakukan karena adanya permasalahan terhadap daya tahan tubuh dan penyakit dari udang budidaya. Salah satu antibiotik yang paling banyak digunakan dalam suatu usaha budidaya adalah kloramfenikol. Penggunaan kloramfenikol dianggap dapat untuk menghambat perkembangan penyakit pada usaha budidaya udang, dapat meningkatkan daya tahan dan sekaligus meningkatkan berat dari udang budidaya. Secara tidak langsung, udang yang mengkonsumsi antibiotik selama hidupnya akan mengandung residu antibiotik pada tubuhnya. Apabila udang tersebut dikonsumsi oleh manusia maka residu antibiotik tersebut akan masuk ke dalam tubuh manusia dan dapat terakumulasi. Residu kloramfenikol dapat menyebabkan gangguan lambung, usus, neuropati optis dan perifer, radang pada mulut dan yang fatal yang adalah kerusakan sumsum tulang belakang [2]. Selain pada kesehatan, dampak kerugian lain adalah pada sektor perekonomian dimana udang yang mengandung kloramfenikol tidak akan bisa diekspor karena banyak negara sudah menetapkan *zero tolerance* terhadap udang yang mengandung kloramfenikol.

Dibutuhkan suatu alat yang dapat mendeteksi residu kloramfenikol dengan kadar yang akurat dan dapat dilakukan dengan cepat. Sensor kloramfenikol yang berbasis BSA dapat digunakan sebagai instrumen untuk mendeteksi residu kloramfenikol pada udang dengan kadar yang tepat. BSA sendiri merupakan suatu protein globular yang memiliki massa yang besar. Sensor ini dikombinasikan dengan menggunakan instrumen yaitu spektrofotometer yang sensitif dan akurat. Kombinasi antara sensor dan instrumen ini akan dapat menghasilkan deteksi yang akurat dengan kadar yang tepat. BSA sebagai protein yang dapat dideteksi kloramfenikol akan dapat berfluoresensi. Ikatan yang dihasilkan antara BSA dan kloramfenikol akan menghasilkan suatu fluoresensi *quenching* sehingga kloramfenikol dapat terdeteksi [3]. Dengan menggunakan prinsip imobilisasi dengan metode adsorpsi [4], maka dapat menghemat penggunaan BSA karena sudah diimobilisasikan pada selulosa asetat dan akan terikat pada selulosa asetat.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menghasilkan kombinasi analisis pemeriksaan residu kloramfenikol pada sampel udang yang akurat, praktis, selektif dan efisien. Diharapkan juga penelitian akan dapat membantu dan mempercepat proses pemeriksaan residu

kloramfenikol pada udang yang ada di pasaran dan dapat mencegah kemungkinan buruk dari adanya residu ini, baik bagi manusia maupun negara.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan Januari 2016 sampai dengan Juli 2016. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer (Photon Technology Instrument), pH meter (Denver), sentrifugasi (Hermle), timbangan analitik (OHAUS).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain udang windu segar yang berasal dari tambak, akuades, BSA (Merck), etanol 96%, trisodium sitrat (Brataco), selulosa asetat, kloramfenikol base, HCl 2 N, HCl 4 N, dan NaOH.

Kondisi Optimum Sensor

Sensor kloramfenikol dibuat dari selulosa asetat didapatkan dari klise film yang dibersihkan dengan HCl 2 N. Selanjutnya selulosa asetat dipotong sesuai dengan ukuran kuvet kerja spektrofotometer yaitu 3 x 1 cm. Sensor kloramfenikol ini bekerja stabil pada pH 8. konsentrasi BSA yang digunakan dalam proses imobilisasi adalah sebesar 1.000 µg/ml dan waktu imobilisasi dengan metode absorpsi adalah selama 18 jam. Panjang gelombang eksitasi dan emisi yang digunakan dalam pengukuran menggunakan spektrofotometer ini adalah 290 nm dan 324 nm.

Preparasi Sampel

Sampel udang segar berasal dari tambak PT Taching Windu Jaya di Situbondo. Beberapa bagian dari udang dibuang seperti kepala, ekor, dan isi perutnya. Kemudian daging dari udang dihaluskan dengan menggunakan mortir. Kemudian ditimbang sebanyak 3 gram udang halus lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Dalam tabung tersebut ditambahkan etanol sebanyak 6 ml. Dikocok selama 3 menit kemudian dimasukkan ke dalam sentrifugasi. Diatur dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Setelah proses sentrifugasi selesai, diambil filtrat pada bagian atas yang terpisah dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Pada labu ukur tersebut ditambahkan dan *dapar* tris-HCl sebanyak ± 6 ml atau hingga ad 10 ml. Setelah itu tabung dikocok selama 2 menit hingga larutan menjadi

homogen. Setelah proses selesai larutan dapat dipindahkan ke dalam kuvet untuk dilakukan proses analisis dengan menggunakan spektrofotometer.

Validasi Sensor Kloramfenikol

Validasi dari sensor kloramfenikol yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu linieritas, batas deteksi, batas kuantifikasi, presisi, akurasi dan selektivitas. Untuk perhitungan batas deteksi dan batas kuantifikasi digunakan aplikasi yaitu *Validation Method of Analysis* [5]. Untuk uji selektivitas sensor kloramfenikol, diberikan 3 buah pengganggu yaitu eritromisin, pakan udang dan daging udang.

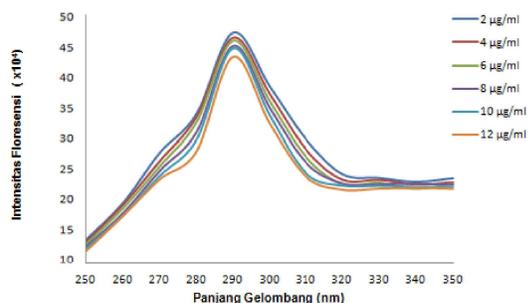
Aplikasi pada Sampel di Pasaran

Dalam penelitian ini digunakan 5 sampel udang yang ada di pasaran yang berasal dari 5 pedagang udang windu yang berbeda. Data yang diperoleh dari hasil sensor kloramfenikol pada pengujian sampel udang yang terdapat di pasaran dibandingkan dengan metode spektrofotometri tanpa menggunakan sensor kloramfenikol. Selanjutnya dianalisis menggunakan uji t tidak berpasangan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nilai rerata dari dua kelompok dengan melihat nilai signifikansinya. Perbedaan bermakna apabila signifikansi < 0,05 dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% [6].

Hasil Penelitian

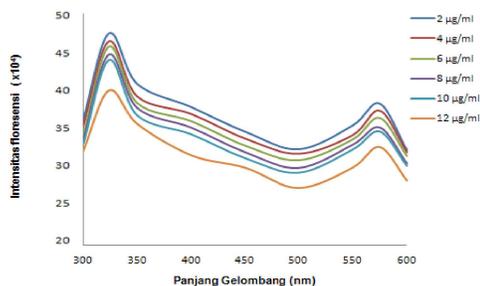
Optimasi Kondisi Analisis

Hasil dari optimasi kondisi analisis dari sensor kloramfenikol. Panjang gelombang maksimum eksitasi dan emisi dari kloramfenikol adalah sebesar 290 nm dan 324 nm. Hasil spektra panjang gelombang eksitasi pada rentang konsentrasi 2-12 µg/ml ditunjukkan pada pada Gambar 1.



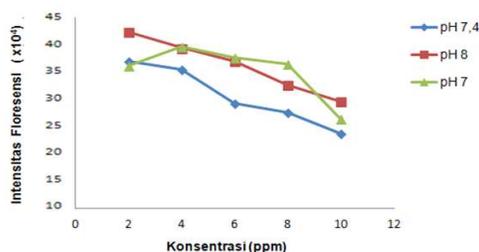
Gambar 1 Spektra panjang gelombang eksitasi

Optimasi panjang gelombang juga dilakukan pada panjang gelombang emisi. Pada Gambar 2 menunjukkan spektra hasil panjang gelombang maksimum emisi pada rentang konsentrasi 2-12 µg/ml.



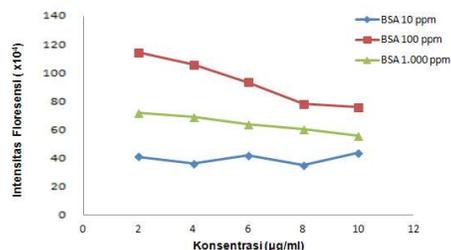
Gambar 2 Spektra panjang gelombang emisi

Sensor kloramfenikol dapat bekerja dengan baik pada pH 8. Hal ini dapat dilihat dari uji pH yang memberikan nilai r yang paling bagus adalah pH 8 seperti pada Gambar 3.



Gambar 3 Grafik optimasi pH sensor

Konsentrasi BSA yang dapat mengikat kloramfenikol paling baik adalah pada konsentrasi 1.000 µg/ml. Dari 3 konsentrasi uji yang dilakukan optimasi, BSA 1.000 µg/ml memberikan nilai r yang paling bagus. Grafik hasil uji optimasi BSA dapat dilihat pada Gambar 4.

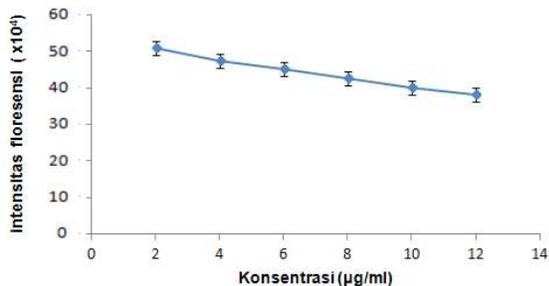


Gambar 4 Grafik optimasi konsentrasi BSA

Waktu yang dibutuhkan untuk imobilisasi BSA dengan metode adsorpsi adalah 18 jam. Pada jam ke-18 memiliki nilai r yang paling bagus yaitu sebesar -0,997.

Validasi Sensor Kloramfenikol

Hasil dari uji linieritas yang dilakukan diperoleh hasil dimana dihasilkan nilai r sebesar -0,997 dan dengan persamaan kurva kalibrasi $y = -12.506x + 528.484$. Kurva hasil pengukuran linieritas ditunjukkan pada Gambar 5.

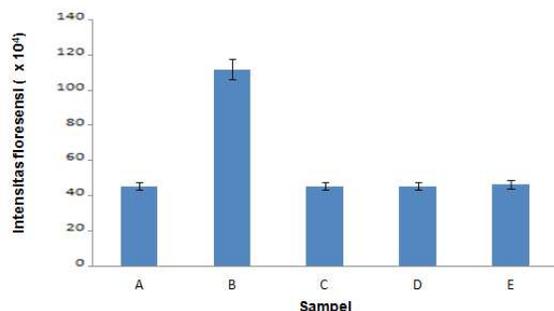


Gambar 5 Kurva kalibrasi linieritas

Nilai batas deteksi dan batas kuantifikasi yang didapat adalah 0,157 µg/ml dan 0,472 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi terkecil kloramfenikol yang masih dapat dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer adalah sebesar 0,157 µg/ml.

Penelitian ini menggunakan 2 jenis pengujian presisi, yaitu keterulangan dan presisi antara. Hasil pengujian keterulangan menunjukkan nilai RSD 1,543% dengan nilai 5 b/b sebesar 0,002065%. Sedangkan pada uji presisi antara didapatkan hasil RSD sebesar 1,058% dan % b/b 0,002079%. pada hasil uji dari akurasi didapatkan hasil *recovery* sebesar 95,339 ± 0,636%.

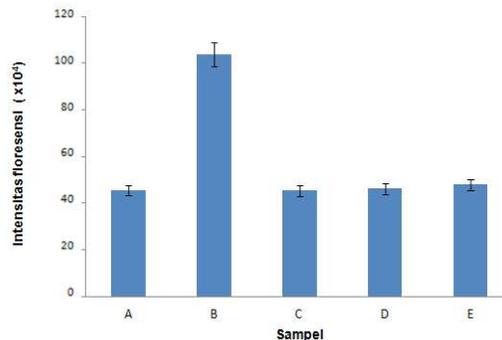
Uji validasi yang terakhir adalah uji selektivitas. Gambar 6 menunjukkan bahwa hasil serapan kloramfenikol tidak terganggu dengan adanya eritromisin. Hal ini diperkuat dengan adanya nilai interferensi yang masing-masing konsentrasi pengganggu yaitu -0,994%, 4,57% dan 4,33%.



Gambar 6 Selektivitas sensor terhadap eritromisin

Keterangan = A : Kloramfenikol; B : Eritromisin; C : Kloramfenikol dan eritromisin 1:1; D : Kloramfenikol dan eritromisin 1:10; E : Kloramfenikol dan eritromisin 1:100

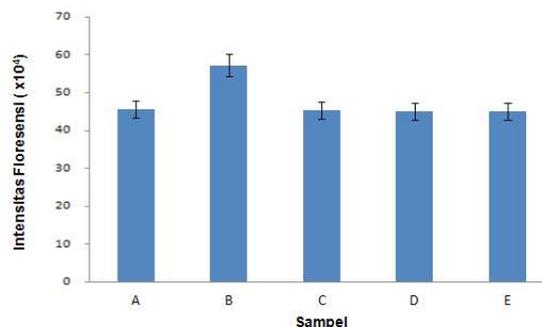
Pada Gambar 7 menunjukkan hasil spektra antara kloramfenikol dan pengganggu berupa pelet dengan 3 konsentrasi yang berbeda. Hasilnya adalah sensor kloramfenikol dapat memberikan hasil yang selektif terhadap pelet pada setiap konsentrasi. Nilai interferensi dari masing konsentrasi pengganggu adalah -0,052%, 1,59% dan 3,66%.



Gambar 7 Selektivitas sensor terhadap pelet

Keterangan = A : Kloramfenikol; B : Eritromisin; C : Kloramfenikol dan pelet 1:1; D : Kloramfenikol dan pelet 1:10; E : Kloramfenikol dan pelet 1:100

Pada Gambar 8 menunjukkan hasil spektra antara kloramfenikol dan pengganggu berupa daging udang dengan 3 konsentrasi yang berbeda. Sensor kloramfenikol tidak terpengaruh terhadap intensitas floresensi dari daging udang. Interferensi yang dihasilkan dari masing-masing pengganggu adalah -0,92%, 1,18% dan 1,69%.



Gambar 8 Selektivitas sensor terhadap daging udang

Keterangan = A : Kloramfenikol; B : Eritromisin; C : Kloramfenikol dan daging udang 1:1; D : Kloramfenikol dan daging udang 1:10; E : Kloramfenikol dan daging udang 1:100

Aplikasi pada Sampel

Hasil yang didapatkan dari pengujian pada sampel yang ada di pasaran adalah 4 dari 5 sampel mengandung kloramfenikol. Hal tersebut telah dibandingkan dengan pengukuran

dengan menggunakan spektrofotometer dan kemudian hasilnya dibandingkan dengan uji t tidak berpasangan. Nilai signifikansi yang dihasilkan adalah 0,902(>0,05) sehingga dapat dinyatakan kedua hasil pengukuran tidak berbeda bermakna.

Pembahasan

Hasil uji linieritas menunjukkan bahwa nilai r yang didapatkan adalah -0,997. Nilai tersebut menunjukkan bahwa metode pengukuran yang dilakukan dapat memberikan perubahan respon deteksi yang proporsional dengan perubahan konsentrasi analit yang diberikan. Nilai minus yang didapatkan pada nilai persamaan regresi karena bentuk kurve yang menurun akibat adanya penurunan intensitas floresensi seiring dengan kenaikan konsentrasi. Batas deteksi dan batas kuantifikasi dilakukan dengan menguji konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil linieritas. Hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai batas deteksi dari sensor kloramfenikol adalah 0,157 µg/ml dan batas kuantifikasi sebesar 0,472 µg/ml. Nilai batas deteksi menunjukkan konsentrasui terkecil yang bisa dideteksi oleh sensor kloramfenikol. Sementara nilai batas kuantifikasi menunjukkan konsentrasi terkecil yang masuk dalam rentang pengukuran akurasi [7].

Pada hasil pengukuran uji presisi, baik uji keterulangan maupun uji presisi atraa menunjukkan nilai RSD yang < 7,3% [8]. Hal ini menunjukkan bahwa pengukuran dengan menggunakan sensor kloramfenikol dapat dinyatakan presis, dimana ketika metode ini dilakukan secara berulang maka dapat memberikan hasil yang mirip atau tidak berbeda jauh. Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan metode adisi dan pada pengujian akurasi didapatkan hasil *recovery* sebesar 95,339% ± 0,636. Untuk rentang pengukuran konsentrasi yang digunakan, maka nilai *recovery* tersebut dinyatakan masuk dalam persyaratan [7]. Berdasarkan hasil tersebut maka sensor kloramfenikol dapat bekerja akurat karena dapat memberikan hasil yang mendekati dengan nilai kadar sesungguhnya.

Uji validasi terakhir yang dilakukan adalah selektivitas. Dari hasil spektra emisi yang dilakukan dapat dilihat bahwa sensor kloramfenikol dapat bekerja secara selektif terhadap eritromisin, pelet dan daging udang itu sendiri. Spektra yang dihasilkan dari kombinasi kloramfenikol dan masing-masing pengganggu dengan perbandingan 1:1; 1:10; dan 1:100

memiliki kesamaan dengan spektra emisi dari kloramfenikol tunggal. Hal tersebut juga dapat di lihat dari nilai intervensi yang yang didapatkan dari perbandingan emisi kombinasi kloramfenikol-pengganggu dan kloramfenikol yang menunjukkan hasil kurang 5% sehingga dapat dikatakan bahwa bahan-bahan pengganggu yang digunakan tidak mengganggu pengukuran dengan sensor kloramfenikol secara signifikan. Oleh karena itu sensor kloramfenikol dapat dikatakan bekerja secara selektif terhadap kloramfenikol.

Tahap selanjutnya adalah aplikasi pada sampel yang ada di pasaran. Pada tahap ini digunakan 5 sampel udang yang berada di pasaran dan seluruhnya merupakan udang windu (*Panaeus monodon*) dari tambak. Hasil analisis menunjukkan bahwa 4 dari 5 sampel udang menunjukkan hasil yang positif ketika diukur dengan sensor kloramfenikol. Hasil pengukuran itu juga dibandingkan dengan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer yang menunjukkan 4 dari 5 sampel juga positif mengandung kloramfenikol. Kemudian dilakukan analisis dengan melakukan uji t tidak berpasangan. Dan hasilnya menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya nilai signifikansi sebesar 0,902, yang merupakan bilangan >0,05. Jika nilai signifikansi >0,05, maka kedua data yang dibandingkan tidak memiliki perbedaan yang bermakna [7]

Simpulan dan Saran

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu sensor kloramfenikol yang dapat bekerja secara baik dalam mendeteksi kloramfenikol yang ada pada sampel udang. Hasil validasi menunjukkan bahwa sensor kloramfenikol memiliki nilai linieritas sebesar -0,997; nilai batas deteksi sebesar 0,157 µg/ml dan batas kuantifikasi sebesar 0,472 µg/ml; presisi dengan rata-rata nilai RSD keterulangan 1,542% dan nilai RSD presisi intermediet sebesar 1,058%; nilai *recovery* sebagai parameter akurasi sebesar 95,338 ± 0,636% dan memiliki selektivitas yang baik terhadap eritromisin, pelet dan daging udang.

Penelitian ini merupakan penelitian awal dari kombinasi antara sensor dan instrumen. Selanjutnya dapat dikembangkan dalam hal validasi seperti waktu pakai dan waktu respon dari sensor ini.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan Terima kasih kepada Laboratorium Kimia dan Sensor Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan dukungan dalam pendanaan penelitian.

Daftar Pustaka

- [1] Putro S. Peran mutu dalam menunjang ekspor udang nasional. *Squalen Bull Mar Fish Postharvest Biotechnol.* 2008;3(1) : 1-6
- [2] Katzung, BG. *Basic & clinical pharmacology.* 10th ed. United States: Lange Medical Publications; 2007.
- [3] Zhang J, Chen L, Zeng B, Kang Q, Dai, L. Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and uv–vis spectroscopy. *Spectrochim. Acta A.* 2013: 105: 74–79.
- [4] Kuswandi B, *Sensor kimia, teori, praktek dan aplikasi.* Jember: Jember University Press; 2010.
- [5] Indrayanto A, Indrayanto G, Mulja M. *Validation method of analysis v.1.03 software from general public license:* Airlangga University Press; 2003
- [6] Dahlan M. *Statistika untuk kedokteran dan kesehatan seri I.* Jakarta: PT Arkans; 2006.
- [7] Harmita. *Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya.* MIK. 2004; 1 (3): 128-134.
- [8] Huber L, *Validation and qualification in analytical laboratories.* New York: Informa Healthcare USA; 2007.