
VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU ANTIBIOTIK ENROFLOKSASIN DALAM SUSU MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Validation of Enrofloxacin Antibiotic Analysis in Milk Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Prima Mei Widiyanti¹, Raphaella Widiastuti¹, Mirnawati B Sudarwanto², Etih Sudarnika²

¹Badan Riset dan Inovasi Nasional, ² Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University
Jl. Raya Jakarta-Bogor Km.46, Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat
Email: primamw@gmail.com

Diterima: 15 November 2021, Direvisi: 31 Januari 2024, Disetujui 3 April 2024

Abstrak

Enrofloksasin merupakan satu dari jenis antibiotik golongan fluorokuinolon yang digunakan untuk terapi pada hewan. Enrofloksasin memiliki spektrum luas, sehingga efektif untuk pengobatan penyakit infeksi bakteri Gram positif dan Gram negatif. Residu antibiotik enrofloksasin dalam susu dapat mempengaruhi kualitas produk dan kesehatan manusia. Penelitian ini bertujuan untuk validasi metode deteksi residu antibiotik enrofloksasin dalam susu menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *high performance liquid chromatography* (HPLC). Tahapan validasi metode deteksi residu antibiotik enrofloksasin dalam susu menggunakan HPLC meliputi spesifisitas, akurasi, presisi, linieritas, limit of detection (LOD), dan limit of quantitation (LOQ). Hasil validasi metode menunjukkan spesifisitas yang baik. Hasil akurasi yang diperoleh menunjukkan persentase rata-rata 98.86% dan presisi dengan nilai relative standard deviation (RSD) adalah 3.75% serta linieritas dengan nilai koefisien determinasi (R^2)=0.999. Hasil LOD adalah 11.44 ppb dan LOQ adalah 15.28 ppb. Validasi metode analisis antibiotik enrofloksasin menggunakan HPLC pada semua parameter validasi menunjukkan hasil yang baik sesuai persyaratan regulasi. Berdasarkan hasil tersebut, maka metode dapat digunakan untuk menganalisis residu antibiotik enrofloksasin dalam sampel susu secara kuantitatif untuk menjamin keamanan pangan asal hewan demi peningkatan kesehatan masyarakat.

Kata kunci: antibiotik, enrofloksasin, KCKT, validasi, susu.

Abstract

Enrofloxacin is one of the fluoroquinolone antibiotic used for therapy in animals. Enrofloxacin has a broad spectrum, which is effective for the treatment of Gram positive and Gram negative bacterial infections. Enrofloxacin antibiotic residues in milk could affect product quality and human health. This study aimed to validate the detection method of enrofloxacin residues in milk using high performance liquid chromatography (HPLC). The step of method validation of the detection method of enrofloxacin residues in milk using HPLC were specificity, accuracy, precision, linearity limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ). The result of the method validation showed good specificity. The accuracy results showed an average percentage of 98.86%, precision with relative standard deviation (RSD) value of 3.75%, and linearity with a coefficient determination of (R^2)=0.999. The result LOD was 11.44 ppb, and the result LOQ was 15.28 ppb. Validation of the enrofloxacin antibiotic analysis method using HPLC on all validation parameters showed good results according to regulatory requirements. The HPLC validated method could be applied to analyze enrofloxacin in milk quantitatively in order to ensure food safety of animal origin for improving public health. Furthermore, in Indonesia the method of analysis has never been used before so that it could be considered by National Standardization Agency of Indonesia (BSN) to become the Indonesian National Standard (SNI) method.

Keywords: antibiotic, enrofloxacin, HPLC, validation, milk.

1. PENDAHULUAN

Peternakan merupakan salah satu sektor penting dalam bidang perekonomian. Peternakan dapat berperan dalam pemenuhan kebutuhan pangan khususnya protein hewani, meningkatkan pendapatan ekonomi masyarakat, dan memperluas kesempatan kerja (As *et al.* 2014; Dianawati dan Mulijanti 2015). Salah satu peternakan yang ada di

Indonesia adalah peternakan sapi perah yang dapat menghasilkan susu. Susu dan produk susu merupakan produk pangan asal hewan yang menyehatkan dan bernutrisi. Permasalahan pada sektor peternakan sapi perah dapat terjadi karena adanya penyakit infeksius. Penyakit infeksius pada sapi perah antara lain dapat disebabkan oleh bakteri. Penanggulangan penyakit infeksi bakteri dapat dilakukan dengan pemberian antibiotik (Priyanka *et al.* 2017; Mellado *et al.* 2018).

Antibiotik dapat digunakan untuk tujuan kemoterapeutik dan profilaktik. Penggunaan antibiotik secara aman dan efektif harus sesuai aturan, karena antibiotik dapat menyebabkan residu pada produk pangan asal hewan. Pemberian antibiotik harus memperhatikan waktu henti obat, sehingga pangan asal hewan aman untuk dikonsumsi masyarakat. Pengendalian dan deteksi residu antibiotik pada pangan asal hewan dapat melindungi kesehatan manusia sebagai konsumen (Jayalakshmi *et al.* 2017; Moghadam *et al.* 2016).

Jenis antibiotik yang dapat diberikan pada sapi diantaranya adalah antibiotik golongan fluorokuinolon (Trouchon dan Lefebvre 2016). Fluorokuinolon dapat digunakan untuk penanganan penyakit pada unggas, sapi, kambing, domba, babi, kuda, dan ikan. Fluorokuinolon merupakan antibiotik yang penting untuk pengobatan penyakit, karena dapat digunakan untuk pengobatan penyakit yang cukup serius dengan infeksi yang spesifik. *World Organisation for Animal Health* mengategorikan fluorokuinolon ke dalam jenis antibiotik (antimikrobia) kriteria paling tinggi sebagai *critically important antimicrobials*, sehingga penggunaan dan residunya pada produk pangan asal hewan perlu mendapat perhatian (OIE 2018).

Enrofloksasin merupakan salah satu jenis antibiotik golongan fluorokuinolon yang banyak digunakan untuk terapi pada hewan. Antibiotik enrofloksasin merupakan antibiotik berspektrum luas, sehingga efektif untuk pengobatan penyakit infeksi bakteri Gram positif dan Gram negatif. Beberapa literatur menyatakan bahwa selain manfaat pengobatan menggunakan antibiotik enrofloksasin, ternyata antibiotik ini dapat menyebabkan gangguan syaraf, kardiotoksik, kebutaan, kematian embrionik serta toksisitas pada lingkungan (ekotoksitas) (Trouchon dan Lefebvre 2016; Wei *et al.* 2018; Hrubá *et al.* 2019). Penggunaan antibiotik enrofloksasin pada hewan yang tidak tepat dan tidak memperhatikan waktu henti dapat menyebabkan residu dan resistansi mikroba, sehingga penggunaan antibiotik termasuk enrofloksasin harus diawasi dan dievaluasi demi keamanan pangan dan kesehatan manusia (Moharana *et al.* 2015).

The European Commission (EC) (2010) menetapkan batas maksimal residu (BMR) atau *maximum residue limit* (MRL) antibiotik enrofloksasin pada susu adalah 100 µg/kg (ppb). Hasil pengujian residu antibiotik di

Cekoslovakia menunjukkan 115 dari 150 sampel susu sapi terdeteksi adanya residu enrofloksasin pada kisaran 1.7-18.6 ppb (Navratilova *et al.* 2011). Pengujian terhadap 119 sampel susu di Kroasia menunjukkan residu enrofloksasin pada kisaran 0.56-22.3 ppb (Bilandzic *et al.* 2011). Penelitian di India menunjukkan 16.8% dari 125 sampel susu terdeteksi enrofloksasin dan 8% diantaranya melebihi BMR (Moharana *et al.* 2015). Penelitian lain mengenai enrofloksasin di India juga menunjukkan beberapa sampel susu masih melebihi BMR (Srinivasu *et al.* 2017; Nirala *et al.* 2017).

Antibiotik enrofloksasin juga digunakan untuk pengobatan penyakit pada hewan di Indonesia (Ambarwati *et al.* 2013), namun deteksi residu antibiotik enrofloksasin pada susu di Indonesia belum pernah dilaporkan, sehingga diperlukan suatu pengembangan metode deteksi antibiotik enrofloksasin dalam susu secara kuantitatif. Pendeteksian dan analisis residu antibiotik secara kuantitatif dapat menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang mempunyai keunggulan dibandingkan *microbial assay*, karena mampu memberi informasi secara kuantitatif dan konfirmatif bahkan hingga konsentrasi rendah di bawah BMR yang tidak dapat dideteksi secara *microbial assay* (Jevinova *et al.* 2003). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis residu antibiotik enrofloksasin dalam susu secara kuantitatif menggunakan HPLC/KCKT agar metode tersebut dapat digunakan untuk memonitor konsentrasi residu antibiotik enrofloksasin dalam susu. Berdasarkan SNI ISO/IEC 17025:2017 validasi merupakan proses konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk maksud terpenuhi dipenuhi. Validasi metode ini penting dilakukan agar hasil analisis yang diperoleh hasilnya valid.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Susu

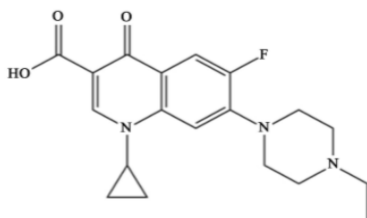
Susu segar (*raw milk*) adalah cairan yang berasal dari ambing sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali pendinginan. Persyaratan susu segar berdasarkan SNI meliputi berat jenis (pada suhu 27.5 °C) minimum 1.0270 g/mL, kadar

lemak minimum 3.0%, kadar protein minimum 2.8%, pH 6.3-6.8 cemaran mikroba *total plate count* (TPC) maksimum 1×10^6 CFU/mL. Susu merupakan sumber protein hewani yang dibutuhkan dalam pertumbuhan dan perkembangan tubuh serta dalam menjaga kesehatan. Susu segar menjadi unsur penting dalam industri pengolahan susu (BSN 2011).

Susu memiliki kandungan nutrisi yang lengkap dibandingkan minuman lainnya sehingga susu memiliki banyak khasiat yang sangat bermanfaat bagi tubuh. Ada banyak kandungan nutrisi yang ada dalam susu yaitu protein, vitamin (A, D, E, B12, B2), lemak (asam lemak *saturated*, *monounsaturated*, *polyunsaturated*), karbohidrat (laktosa), dan mineral (kalium, kalsium, phosphor, klorida, fluor, natrium, magnesium, zink, ferum, cuprum). Kandungan gizi ini bermanfaat untuk menunjang kesehatan tubuh. Selain itu, susu mengandung enzim-enzim, air, dan senyawa bioaktif dalam jumlah yang memadai. Protein diperlukan untuk regenerasi sel-sel baru dan pembentukan sel otak pada janin, membentuk enzim dan hormon serta energi. Kalsium dalam susu mempunyai berbagai fungsi di dalam tubuh antara lain pembentukan tulang dan gigi, mengatur reaksi biologi, membantu kontraksi otot, dan mengatur pembekuan darah (Wardyaningrum 2011; Mourad *et al.* 2014).

Enrofloksasin

Enrofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon (generasi kedua kuinolon). Pada antibiotik fluorokuinolon terdapat penambahan atom fluor pada posisi ke-6 yang dapat meningkatkan spektrum antibakterial (Gambar 1). Enrofloksasin merupakan antibiotik berspektrum luas yang efektif untuk bakteri Gram positif dan negatif (Troughon dan Lefebvre 2016).



Gambar 1 Struktur kimia antibiotik enrofloksasin
Sumber: Troughon dan Lefebvre (2016).

Mekanisme kerja antibiotik enrofloksasin yaitu menghambat *deoxyribonucleic acid* (DNA) *gyrase* (topoisomerase II) dan topoisomerase IV yang diperlukan oleh bakteri

untuk replikasi DNA. Hambatan ini menghasilkan efek sitotoksik pada sel target. Mekanisme kerja antibiotik enrofloksasin berbeda dengan antibiotik lainnya seperti golongan beta laktam, makrolida, tetrasiklin, dan aminoglikosida. Enrofloksasin mengandung ikatan fluor (gugus fluorida) di tengah struktur kimianya, gugus fluorida tersebut telah diketahui bersifat neurotoksik dan dapat berpenetrasi ke dalam jaringan yang sensitif termasuk otak. Kemampuan fluorida untuk menembus *blood-brain barrier* membuat fluorida bersifat neurotoksik kuat. Fluorida juga mengganggu sintesa kolagen dan dapat merusak sistem imun dengan menghabiskan persediaan energi dan menghambat pembentukan antibodi dalam darah (Babaahmady dan Khosravi 2011; Raini 2016).

Enrofloksasin merupakan antibiotik yang diperbolehkan untuk pengobatan dan efektif untuk melawan mikroba yang sudah resistan terhadap antibiotik golongan aminoglikosida, beta laktam, makrolida, dan tetrasiklin. Penggunaan antibiotik enrofloksasin pada hewan yang masih laktasi dapat menimbulkan residu antibiotik pada susu yang diproduksinya. Waktu henti obat antibiotik enrofloksasin dengan dosis 2.5 mg/kg berat badan pemberian secara *intramuscular* adalah pada hari ke-6. Pada hari ke-6 sudah tidak ditemukan lagi adanya residu antibiotik, sehingga susu sudah aman untuk dikonsumsi kembali (Mahmood *et al.* 2016).

Residu Antibiotik dalam Susu

Residu antibiotik merupakan terdapatnya sejumlah antibiotik atau hasil metabolit antibiotik pada jaringan atau produk hewan (daging, susu, telur, dan lainnya), setelah hewan diberikan antibiotik. Residu antibiotik pada produk hewan dapat berdampak pada kesehatan masyarakat dan sektor perekonomian. Residu antibiotik dapat mengakibatkan reaksi alergi, resistansi mikroba, karsinogen, toksisitas, dan penolakan produk (Asredie dan Engdaw 2015).

Pada aspek teknologi, residu antibiotik dalam susu dapat mengganggu proses fermentasi produk susu yang menggunakan *starter*, antara lain yoghurt, keju, mentega, kefir, koumis, dan susu fermentasi lainnya. Residu antibiotik juga dapat berdampak pada lingkungan dan dapat menyebabkan toksisitas pada ekosistem akuatik antara lain alga, hewan vertebrata, dan invertebrata (Jayalakshmi *et al.* 2017; Troughon dan Lefebvre 2016).

Deteksi residu antibiotik dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain *microbial inhibition test*, biosensor, *charm II*, *enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA), *high performance liquid chromatography* (HPLC), dan *liquid chromatography mass spectrometry* (LCMS) (Jayalakshmi *et al.* 2017; Priyanka *et al.* 2017). Analisis residu antibiotik enrofloksasin secara kuantitatif sebaiknya menggunakan HPLC (Trouchon dan Lefebvre 2016; Moharana *et al.* 2015; Mohammed *et al.* 2016).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu campuran menggunakan fase gerak (*mobile*) dan fase diam (*stationer*). Prinsip pemisahan kromatografi yaitu adanya distribusi komponen dalam fase diam dan fase gerak berdasarkan perbedaan fisik komponen yang akan dipisahkan. HPLC atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan pengembangan dari kromatografi cair kolom klasik. Pada HPLC terdapat teknologi pompa bertekanan tinggi yang menyebabkan HPLC menjadi suatu metode dengan sistem pemisahan zat yang cepat dan efisien. HPLC dapat digunakan untuk senyawa yang memiliki titik didih tinggi dan tekanan uap rendah (tidak mudah menguap). Komponen HPLC meliputi sistem fase gerak, alat penginjeksi, kolom, pompa, detektor, dan sistem pencatatan data (Lestari 2007; Ardianingsih 2009; Aulia *et al.* 2017).

Detektor pada HPLC meliputi detektor ultraviolet (UV), *photodiode array* (PDA), fluoresensi, dan elektrokimia. Pemisahan analit dari komponen-komponen lainnya terjadi di dalam kolom HPLC (Sabir *et al.* 2013; Aulia *et al.* 2017). Sampel masuk melalui alat penginjeksi, kemudian pompa akan membawa sampel dan fase gerak menuju kolom (Thammana 2016). HPLC memiliki keunggulan antara lain mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, mudah dalam pengoperasian instrumentasinya, memiliki kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, dapat menghindari dekomposisi bahan yang dianalisis, memiliki resolusi yang baik, dan dapat menggunakan bermacam-macam detektor (Ardianingsih 2009).

3. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang diperlukan pada penelitian ini meliputi standar antibiotik enrofloksasin (Sigma-Aldrich, 039M4798V), susu sapi segar, metanol *grade* (Merck), *trichloroacetic acid* (TCA), dan asetonitril *grade* (Merck).

Alat yang digunakan meliputi mikropipet, timbangan analitik, sentrifus, *shaker*, sonikator, *hot plate*, *thermocouple*, kolom *solid phase extraction* (SPE) (Oasis HLB, Waters), autoklaf, kolom HPLC (Sunfire, Waters), dan sistem HPLC dengan detektor PDA.

Analisis Residu Antibiotik Enrofloksasin dalam Susu Menggunakan HPLC/KCKT

Analisis residu antibiotik enrofloksasin dalam susu menggunakan HPLC mengacu pada metode yang telah dikembangkan oleh Cinquina *et al.* (2003) dengan modifikasi. Sebanyak 5 mL susu ditambah 2.5 mL 20% TCA dalam metanol. Selanjutnya dikocok menggunakan *shaker* selama 15 detik, lalu disentrifus 1500 rpm selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 12.5 mL dapar fosfat (pH 7.4), dan disentrifus 1500 rpm selama 15 menit. Supernatan dimasukkan ke dalam kolom SPE yang telah diaktivasi menggunakan 6 mL metanol, 6 mL akuades, dan 6 mL dapar fosfat. Setelah itu, kolom SPE dicuci dengan 2 mL akuades, dan dikeringkan selama 3 menit. Selanjutnya SPE dielusi dengan 2 mL 1% TCA dalam asetonitril. Sampel dikeringkan menggunakan nitrogen alir, lalu ditambahkan larutan fase gerak 200 μ L, kemudian sampel siap dianalisis menggunakan HPLC.

Analisis residu antibiotik enrofloksasin menggunakan HPLC Shimadzu LC-20AD dengan detektor PDA dan kolom HPLC jenis C₁₈ (5 μ m; 4.6 x 250 mm). Fase gerak yang digunakan adalah campuran 0.02 M TCA, metanol, dan asetonitril dengan perbandingan 74:4:22, disaring menggunakan kertas *filter* diameter 0.45 μ m serta disonikasi selama 10 menit. Laju alir fase gerak dalam HPLC adalah 1.4 mL/menit, dengan volume sampel yang diinjeksikan sebanyak 20 μ L dan dibaca pada panjang gelombang 277 nm.

Validasi Metode

Validasi metode analisis dilakukan dengan menilai parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

Tahapan validasi metode menurut FDA (2019) meliputi:

- Spesifisitas merupakan kemampuan metode analisis yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama. Standar antibiotik enrofloksasin, pelarut, sampel susu tanpa antibiotik enrofloksasin (blanko), dan sampel susu yang ditambahkan antibiotik enrofloksasin (*spiked*) dianalisis menggunakan HPLC, kemudian diamati waktu retensinya.
- Akurasi (ketepatan) merupakan kemampuan metode analisis untuk menentukan kadar analit yang sebenarnya (ketepatan pengukuran). Sampel susu tanpa antibiotik enrofloksasin (blanko), sampel susu yang telah di-*spiked* antibiotik enrofloksasin konsentrasi 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb (sebelum dilakukan ekstraksi), dan standar antibiotik enrofloksasin dengan 3 kali ulangan dianalisis dengan HPLC kemudian dihitung persentase akurasi.

$$\text{Rumus akurasi} = \frac{(C1-C2)}{C3} \times 100\%$$

Keterangan:

C1 = Konsentrasi sampel susu setelah di-*spiked*

C2 = Konsentrasi blanko

C3 = Konsentrasi standar antibiotik enrofloksasin yang di-*spiked*

- Presisi merupakan ukuran kedekatan antara serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel yang sama. Sampel dianalisis dengan minimal 6 kali ulangan, kemudian dihitung *relative standard deviation* (RSD).
- Linieritas merupakan kemampuan metode analisis memberikan respon sesuai dengan konsentrasi standar. Standar antibiotik enrofloksasin disiapkan dengan 6 konsentrasi bertingkat, kemudian dibuat linieritasnya dan nilai regresi (R^2).
- *Limit of detection* (LOD) atau batas deteksi merupakan konsentrasi terendah dari sampel yang dapat dideteksi tanpa harus bisa dikuantitasi. *Limit of quantitation* (LOQ) atau batas kuantitasi merupakan konsentrasi terendah dalam sampel yang dapat dideteksi dan dikuantitasi.

Perhitungan LOD dan LOQ menurut APVMA (2014) dihitung berdasarkan rata-rata konsentrasi terendah ditambah 3 dan 10 kali *standard deviation* (SD).

Analisis Data

Data penelitian tentang validasi metode dianalisis dengan menghitung RSD, membuat grafik *scatter plot*, dan analisis regresi linier.

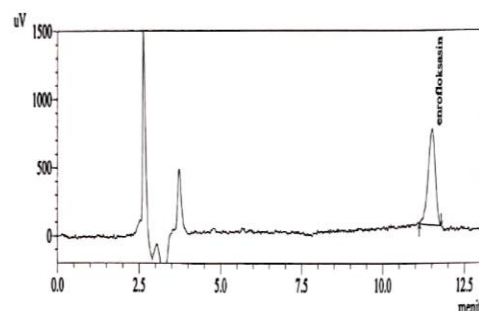
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis residu antibiotik enrofloksasin dalam susu dilakukan menggunakan HPLC/KCKT dengan detektor PDA, dengan hasil optimal pada panjang gelombang 277 nm. Sampel susu yang digunakan pada penelitian ini merupakan susu sapi segar berasal dari peternakan Fakultas Peternakan IPB.

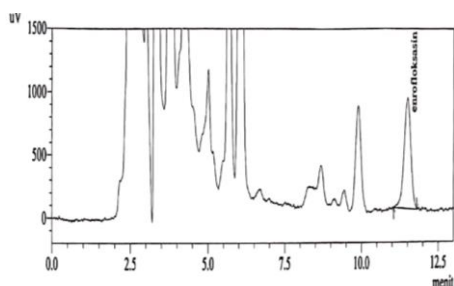
Validasi Metode Analisis Residu Enrofloksasin dalam Susu dengan HPLC

Spesifisitas

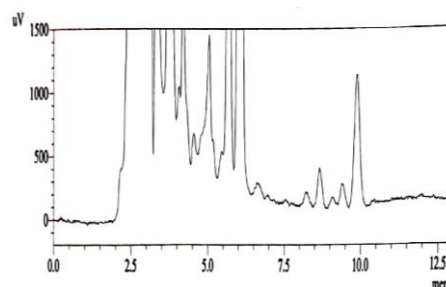
Hasil penelitian validasi metode deteksi antibiotik enrofloksasin menunjukkan spesifisitas yang baik. Standar antibiotik enrofloksasin yang dideteksi menggunakan HPLC dengan panjang gelombang 277 nm menunjukkan adanya *peak* (puncak) pada kromatogram standar antibiotik enrofloksasin (Gambar 2) dan *spiked* antibiotik enrofloksasin dalam sampel susu (Gambar 3), sedangkan pada kromatogram pelarut (Gambar 4) dan blanko sampel susu (Gambar 5) tidak menghasilkan *peak* antibiotik enrofloksasin.



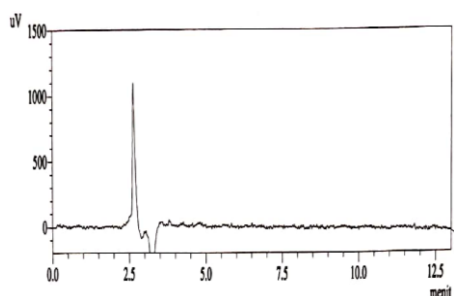
Gambar 2 Kromatogram standar antibiotik enrofloksasin menggunakan HPLC.



Gambar 3 Kromatogram *spiked* antibiotik enrofloksasin dalam sampel susu menggunakan HPLC.



Gambar 5 Kromatogram blanko sampel susu menggunakan HPLC.



Gambar 4 Kromatogram pelarut (fase gerak) menggunakan HPLC.

Akurasi

Hasil data akurasi dengan konsentrasi antibiotik enrofloksasin yang di-*spiked* 50 ppb, 100 ppb dan 200 ppb dengan 3 kali ulangan pada susu dapat dilihat pada Tabel 1. Akurasi pada validasi metode analisis enrofloksasin menghasilkan nilai rata-rata total 98.86%. Menurut FDA (2019), nilai akurasi yang baik untuk analit dengan BMR 100 ppb adalah 80-110%, sehingga hasil akurasi 98.86% memenuhi persyaratan persentase akurasi. Persentase akurasi antara 75-125% dinilai memenuhi syarat akurat untuk analisis kuantitatif (APVMA 2014). Semakin dekat hasil analisis yang diperoleh dengan nilai yang sebenarnya, maka akurasinya semakin tinggi. Parameter akurasi pada penelitian ini menunjukkan hasil yang lebih baik dari penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Cinquina *et al.* (2003) dengan nilai rata-rata akurasi 84%.

Tabel 1 Data akurasi antibiotik enrofloksasin dalam susu menggunakan HPLC.

Ulangan	Persentase akurasi (%)		
	Konsentrasi 50 ppb	Konsentrasi 100 ppb	Konsentrasi 200 ppb
1	93.46	105.72	99.17
2	92.26	101.22	99.06
3	92.76	106.01	100.09
Rataan (%)	92.83	104.32	99.44
Rataan total (%)	98.86		

Presisi

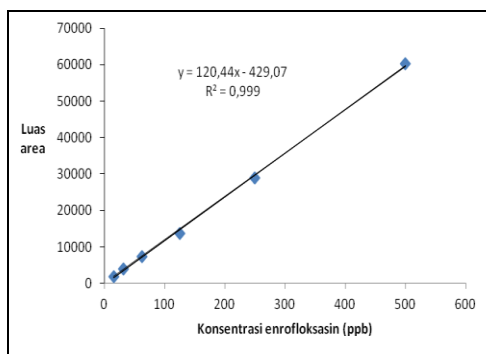
Hasil penelitian menunjukkan RSD presisi adalah 3.75% (Tabel 2). Persyaratan mengenai validasi metode analisis kriteria penerimaan RSD adalah tidak melebihi dari 11% (FDA 2019), sehingga hasil penelitian ini memenuhi persyaratan validasi. Hasil presisi pada penelitian ini lebih baik dari penelitian yang dilakukan oleh Navratilova *et al.* (2011) yaitu sebesar 7.1%.

Tabel 2 Data presisi antibiotik enrofloksasin dalam susu menggunakan HPLC.

Ulangan	Hasil konsentrasi antibiotik enrofloksasin (ppb)
1	198.34
2	180.57
3	192.58
4	197.49
5	198.12
6	200.19
RSD	3.75%

Linieritas

Linieritas dilakukan dengan membuat persamaan garis pada 6 konsentrasi bertingkat standar antibiotik enrofloksasin yaitu 500 ppb, 250 ppb, 125 ppb, 62.5 ppb, 31.25 ppb, dan 15.625 ppb. Hasil analisis regresi linier menunjukkan nilai koefisien determinasi (R^2)=0.999 (Gambar 6). Hal tersebut menunjukkan hubungan linieritas yang kuat karena terdapat hubungan yang linier antara konsentrasi dengan luas area puncak antibiotik enrofloksasin. Hasil penelitian ini memiliki koefisien determinasi yang sedikit lebih tinggi dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Navratilova *et al.* (2011) dengan nilai R^2 =0.98.



Gambar 6 Linieritas standar antibiotik enrofloksasin menggunakan HPLC.

Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantitation (LOQ)

Hasil perhitungan LOD residu antibiotik enrofloksasin adalah 11.44 ppb dan hasil LOQ residu antibiotik enrofloksasin adalah 15.28 ppb (Tabel 3). Menurut FDA (2019), nilai LOQ dengan batas regulasi analit 100 ppb adalah maksimal 20 ppb, sehingga nilai LOQ hasil penelitian (15.28 ppb) sudah masuk dalam kriteria validasi metode pengujian. Nilai LOQ juga di bawah regulasi EC (2010) yang menyatakan bahwa batas BMR antibiotik enrofloksasin pada susu adalah 100 µg/kg (ppb), sehingga metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi hingga konsentrasi rendah di bawah BMR.

Tabel 3 Data LOD dan LOQ enrofloksasin dalam susu menggunakan HPLC.

No.	Konsentrasi (ppb)
1	9.41
2	9.50
3	9.36
4	10.94
5	10.01
6	9.68
7	9.68
<hr/>	
Rataan (\bar{x})	9.80
Standard deviation (SD)	0.55
LOD= (\bar{x}) + 3SD	11.44
LOQ= (\bar{x}) + 10SD	15.28

Validasi metode analisis antibiotik enrofloksasin menggunakan HPLC pada semua parameter validasi menunjukkan hasil yang baik (valid). Hasil tersebut semuanya sesuai kriteria persyaratan regulasi FDA (2019) tentang validasi metode analisis. Berdasarkan hasil tersebut, maka metode tersebut dapat digunakan untuk menganalisis residu antibiotik enrofloksasin dalam sampel susu secara kuantitatif di bawah BMR. Selain itu, di Indonesia belum tersedia metode analisis untuk mendeteksi antibiotik enrofloksasin pada sampel susu, sehingga dapat menjadi pertimbangan Badan Standardisasi Nasional (BSN) untuk menjadi metode Standar Nasional Indonesia (SNI).

5. KESIMPULAN

Validasi metode analisis antibiotik enrofloksasin dalam susu menggunakan HPLC/KCKT yang meliputi spesifisitas, akurasi, presisi, linieritas, LOD dan LOQ hasilnya baik (valid) dan memenuhi persyaratan parameter validasi metode analisis, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis antibiotik enrofloksasin dalam susu untuk menjamin keamanan pangan asal hewan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Pertanian yang telah mendanai dan mensupport penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, Ariyani N, Palupi MF. 2013. Validasi metode spektrofotometri pada uji kadar sediaan injeksi obat hewan enrofloxacin. *JSV*. 31(2):266-273.
- [APVMA] Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2014. Validation of analytical methods for active constituents and agricultural products. [diunduh 2020 Jan 9]. Tersedia pada: <https://apvma.gov.au/node/1048>.
- Ardianingsih R. 2009. Penggunaan high performance liquid chromatography (HPLC) dalam proses analisa deteksi ion. *Berita Dirg*. 10(4):101-104.
- As ZA, Hardiono, Syarifudin A. 2014. Percobaan produksi biogas dari kotoran sapi dan kotoran ayam dengan penambahan enzim papain. *J Kes Ling*. 11(1):177-183.
- Asredie T, Engdaw TA. 2015. Antimicrobial residues in cow milk and its public health significance. *J Dairy Food Sci*. 10(2):147-153.
- Aulia SS, Sopyan I, Muchtaridi. 2017. Penetapan kadar simvastatin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT):review. *Farmaka*. 14(4):70-78.
- Babaahmady E, Khosravi A. 2011. Toxicology of baytril (enrofloxacin). *Afr J Pharm Pharmacol*. 5(18):2042-2045.
- Bacanli M, Basaran N. 2019. Importance of antibiotic residues in animal food. *J Food Chem Tox*. 125:462-466.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2011. SNI 3141.1-2011 tentang Susu Segar bagian 1: Sapi. Jakarta: BSN.
- Bilandzic N, Kolanovic BS, Varenina I, Jurković Z. 2011. Concentrations of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia. *Mljekarstvo*. 61(3):260-267.
- Cinquina, AL, Roberti P, Giannetti L, Longo F, Draisci R, Fagiolo A, Brizioli NR. 2003. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chrom*. 987:221-226.
- Dianawati M, Mulijanti SL. 2015. Peluang pengembangan biogas di sentra sapi perah. *J Lit Pertanian*. 34(3):125-134.
- [EC] The European Commission. 2010. Commission regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin [Internet]. [diunduh 2019 Mei 20]. Tersedia pada: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2019. Guidelines for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics, and veterinary products [Internet]. [diunduh 2020 Feb 10]. Tersedia pada: <https://www.fda.gov/media/81810/download>.
- Hruba H, Abdelsalam EEE, Anisimov N, Bandouchova H, Havelkova B, Heger T, Kanova M, Kovacova V, Nemcova M, Piatek V, et al. 2019. Reproductive toxicity of fluorokuinolones in birds. *BMC Vet Res*. 15(209):1-8.
- Jayalakshmi K, Paramasivam M, Sasikala M, Tamilam TV, Sumithra A. 2017. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health, *J Entomol Zool Std*. 5(3):1446-1451.
- Jevinova P, Dudrikova E, Sokol J, Nagy J, Mate D, Pipova M, Cabadaj R. 2003. Determination of oxytetracycline in milk with the use of HPLC method and two microbial inhibition assays. *Bull Vet Inst Pulaway*. 47:211-216.
- Lestari F. 2007. *Bahaya Kimia: Sampling dan Pengukuran Kontaminan Kimia di Udara*. Jakarta (ID): EGC.
- Mahmood T, Abbas M, Ilyas S, Fzal N, Nawaz R. 2016. Quantification of fluoroquinolon (enrofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin) residues in cow milk. *IJCBS*. 10:10-15.
- Mellado M, Garcia JE, Deras FGV, Santiago MA, Mellado J, Gaytan LR, Garcia OA. 2018. The effect of periparturient events, mastitis, lameness and ketosis, on reproductive performance of Holstein cows in a hot environment. *Austral J Vet Sci*. 50:1-8.
- Moghadam MM, Amiri M, Riabi HR, Riabi HR. 2016. Evaluation of antibiotic residues in pasteurized and raw milk distributed in the south of Khorasan-e Razavi province, Iran. *J Clin Diagn Res*. 10(12):31-35.
- Mohammed HA, Abdou AM, Eid AM, Zakaria AM. 2016. Rapid test for detection of enrofloxacin residues in liquid milk. *BVMJ*. 30(1):97-103.

- Moharana B, Venkatesh PK, Preetha SP, Selvasubramanian S. 2015. Quantitation of enrofloxacin residues in milk sample using RP-HPLC. *World J Pharm Sci.* 4(10):1443-1450.
- Mourad G, Bettache G, Medjekal S. 2014. Composition and nutritional value of raw milk. *Issues Biol Sci Pharm Res.* 2(10):115-122.
- Navratilova P, Borkovcova I, Vyhnalkova J, Vorlova L. 2011. Fluoroquinolone residues in raw cow's milk. *Czech J Food Sci.* 29(6):641-646.
- Nirala RK, Anjana K, Mandal KG, Jayachandran C. 2017. Persistence of antibiotic residue in milk under region of Bihar, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 6(3):2296-2299.
- [OIE] Office Internationale des Epizooties. 2018. OIE list of antimicrobials of veterinary importance [Internet]. [diunduh 2019 Mei 23]. Tersedia pada: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf.
- Priyanka, Panigrahi S, Sheoran MS, Ganguly S. 2017. Antibiotic residues in milk a serious public health hazard. *J Environ Life Sci.* 2(4):99-102.
- Raini M. 2016. Antibiotik golongan fluorokuinolon: manfaat dan kerugian. *Media Litbangkes.* 26(3):163-174.
- Sabir AM, Moloy M, Parminder B. 2013. HPLC method development and validation: a review. *Int Res J Pharm.* 4(4):39-46.
- Srinivasu M, Ahmad AH, Kumar N, Pant D, Ahmad W. 2017. Screening of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin residues by high performance liquid chromatography in cow milk of district Udham Singh Nagar, Uttarakhand. *Int J Livest Res.* 7(7):140-145.
- Thammana M. 2016. A review on high performance liquid chromatography (HPLC). *J Pharm Analysis.* 5(2):22-28.
- Trouchon T, Lefebvre S. 2016. A review of enrofloxacin for veterinary use. *J Vet Med.* 6:40-58.
- Wardyaningrum D. 2011. Tingkat cognisi tentang konsumsi susu pada ibu peternak sapi perah di Lembang Jawa Barat. *J Al-Azhar Indon Pra Sos.* 1(1):19-26.
- Wei Z, Wang J, Zhu L, Wang J, Zhu G. 2018. Toxicity of enrofloxacin, copper and their interactions on soil microbial populations and ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *Sci Reports.* 8(5828):1-9.