

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS UNTUK DETEKSI RESIDU  
FLUOROKUINOLON DI DALAM PRODUK MAKANAN  
(Ulasan Ilmiah/Review Article)**

**<sup>1</sup>MUHAMMAD ZAHID DAN <sup>2</sup>ISNINDAR**

<sup>1</sup>*Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340*

<sup>2</sup>*Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas  
Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat*

**ABSTRAK**

Untuk mendeteksi atau menghitung kontaminan atau residu antibiotik golongan fluokuinolon di dalam makanan dikenal 2 (dua) metode analisis, yaitu metode instrumentasi kimia dan bioanalisis. Metode instrumentasi termasuk kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), kromatografi cair spektrometri masa, gas kromatografi, elektroforesis kapiler, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi, adapun metode bioanalisis terdiri dari *immunoassay*, imunokromatografi, imunosensor, dan kromatografi imunoafinitas kinerja tinggi. Kedua metode analisis residu tersebut mampu memberikan sensitifitas dan spesifisitas yang sangat tinggi dan baik.

**Kata kunci: metode analisa, residu, fluorokuinolon, produk makanan**

**ABSTRACT**

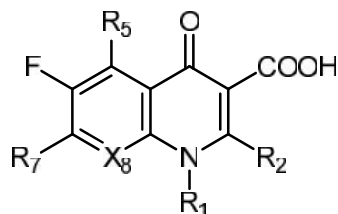
*Generally, there are two analytical methods are applied to detect or quantify contaminants or residues of fluoroquinolone antibiotic group in food products, namely chemically instrument-based method and bioanalytical method. Instrument-based method includes high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) gas chromatography (GC), capillary electrophoresis, thin layer chromatography (TLC), and high performance thin layer chromatography (HPTLC), whereas bioanalytical method consists of immunoassays, immunochromatography, immunosensors, and high performance immunoaffinity chromatography (IAC). Both methods are able to provide highly and better sensitivity and specificity.*

**Key words: analytical methods, residues, fluoroquinolone, food products**

## **1. Pendahuluan**

Antibakterial dari golongan kuinolon sangat efektif terhadap bakteri Gram negatif, akan tetapi kurang efektif terhadap bakteri Gram positif. Generasi terbaru dari kuinolon yaitu fluorokuinolon diproduksi untuk meningkatkan aktifitas antibakterial terhadap bakteri Gram positif dikarenakan adanya penambahan gugus fungsi amino dan atom fluorin <sup>(2)</sup>. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1, struktur dasar FQ memiliki beberapa fitur sebagai berikut: sebuah atom nitrogen pada posisi 1 pada struktur cincin aromatik bisiklik, kelompok asam karboksilat pada posisi 3 penting untuk aktivitas antimikroba dan atom fluor pada posisi 6 berfungsi untuk meningkatkan efektivitas dan spektrum aktivitas terhadap bakteri Gram

negatif dan positif<sup>(3)</sup>. Fluorokuinolon secara luas digunakan pada hewan untuk mengobati penyakit *Chronic Respiratory Disease (CRD) complex, pneumonia, colibacillosis, snot/infectious coryza, fowl cholera, salmonellosis, staphylococcus, streptococcus, fowl thypoid, pullorum, Mycoplasmosis*, infeksi kulit, jaringan lunak dan saluran kemih<sup>(3)</sup>.



**Gambar 1. Struktur kimia umum fluorokuinolon**

Makanan merupakan campuran kompleks dari lemak, karbohidrat, protein, vitamin, senyawa organik, dan bahan campuran alami lainnya<sup>(50)</sup>. Makanan terkadang terpapar oleh residu pestisida, residu obat hewan maupun obat manusia, toksin mikroba atau kontaminan lain yang terjadi selama proses produksi, pengemasan hingga pengangkutan makanan. Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode yang cepat, sederhana dan akurat untuk analisis kontaminan guna menyediakan makanan yang aman dan sehat. Metode instrumentasi kimia dan bioanalisis merupakan 2 (dua) metode yang paling umum digunakan untuk analisis residu atau kontaminan di dalam makanan. Dalam artikel ini akan dibahas mengenai metode-metode tersebut dan aplikasinya dalam penentuan atau deteksi serta kuantifikasi terhadap residu antibiotik fluorokuinolon dalam produk makanan.

## 2. Tinjauan Umum

Pada umumnya, ada 2 (dua) teknik analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkuantitasi residu antibiotik di dalam makanan, yaitu metode konvensional menggunakan instrument dan metode *immunoassay* yang berdasarkan pada interaksi ikatan antigen-antibodi. Metode berdasar instrumen termasuk KCKT dengan detektor *UV/fluorescence*<sup>(7,16,28,58)</sup>, *KC/MS*<sup>(38)</sup>, *KC-MS/MS*<sup>(31)</sup>, *capillary electrophoresis*<sup>(17)</sup>, *KG*<sup>(48)</sup>, *KLT* dan *KLTKT*<sup>(9,18)</sup>.

Metode instrumentasi dan *immunoassay* mempunyai keunggulan yaitu sangat sensitif, spesifik dan memiliki akurasi yang tinggi. Keuntungan khusus lain dari metode *immunoassay* yaitu sederhana, cepat, ekonomis, dapat menganalisis sampel dalam jumlah yang banyak

secara simultan, serta tersedia *kits* untuk analisis senyawa tunggal maupun multi komponen dalam suatu sampel<sup>(47)</sup>.

### 3. Metode Instrumentasi Kimia

Metode instrumentasi kimia memberikan hasil analisis dengan tingkat sensitifitas, selektifitas dan akurasi yang tinggi, namun metode ini membutuhkan persiapan sampel yang intensif dan pembersihan sampel (*sample clean-up*) sehingga membutuhkan waktu yang lama, serta memerlukan bahan dan pelarut kimia yang banyak<sup>(1,32)</sup>. Beberapa metode instrumentasi kimia untuk analisis residu antibiotik fluorokuinolon di dalam produk makanan asal hewan dan laut, antara lain menggunakan KCKT<sup>(7,12,16,20,22,23,24,28,29,40,44,58,61)</sup>, KCMS<sup>(38)</sup>, LC-MS/MS<sup>(14,30,31,48,49,51,53)</sup>, *capillary electrophoresis*<sup>(17)</sup>, KG<sup>(48)</sup>, KLT dan KLTKT<sup>(9,10,11,18)</sup>.

#### 3.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT telah dikembangkan untuk mendeteksi residu fluorokuinolon di dalam makanan asal hewan selama 2 dekade terakhir. Pemisahan biasanya dilakukan dengan menggunakan kolom fase terbalik berbasis silika (*silica-based reversed-phased columns*), umumnya C<sub>18</sub> atau C<sub>8</sub>, akan tetapi sering juga menggunakan kolom dengan bahan dasar fenil dan amida. Karena adanya residu grup silanol dan ion logam di dalam bahan dasar kolom (*column-packing material*) fase terbalik konvensional, maka sering muncul *tailing peaks* pada hasil kromatogram. Oleh karena itu, penggunaan *end capped columns* atau *ultra purity silica columns*, seperti Inertsil, Kromasil, Puresil, LUNA atau Zorbax RX, yang relatif bebas dari residu logam dan grup silanol sangat dianjurkan<sup>(21)</sup>. Untuk kelompok kuinolon asam (*acidic quinolone group*, AQ), panjang gelombang eksitasi dan emisi) diatur masing-masing pada 325 dan 360 nm, sedangkan untuk kelompok kuinolon piperazinil (*piperazinyl quinolone groups*, PQ) diatur masing-masing pada 275-280 nm dan 440-450 nm<sup>(21)</sup>.

Detektor fluoresens (*Fluorescence Detector*, FLD) yang paling umum digunakan dalam KCKT karena lebih sensitif dan selektif daripada UV atau *diode array detection* (DAD)<sup>(28,29,44,58)</sup>. Sebagai contoh nilai batas deteksi (*limit of detection*, LOD) dan batas kuantifikasi (*limit of quantification*, LOQ) yang diperoleh dengan menggunakan detektor fluoresen adalah masing-masing 0,5-30 µg L<sup>-1</sup> 1 µg L<sup>-1</sup><sup>(29,58)</sup>. Nilai LOD dan LOQ tersebut sangat rendah jika dibandingkan dengan menggunakan DAD yaitu masing-masing 50 µg L<sup>-1</sup> and 20 µg L<sup>-1</sup><sup>(12)</sup>. Selain itu, nilai LOD yang rendah diperoleh dengan menggunakan FLD yaitu 25 µg kg<sup>-1</sup> di dalam daging ayam, 5-20 µg kg<sup>-1</sup> di dalam telur, dan nilai LOQ adalah 2,4-10µg L<sup>-1</sup> di dalam susu<sup>(36,37,59)</sup>.

#### 3.2 Kromatografi Cair Spektrometri Masa (KC-MS)

KC-MS adalah sebuah teknik yang menggabungkan teknik pemisahan secara fisika dari KC dengan kapabilitas analisis masa dari MS. KC-MS dikembangkan untuk meningkatkan sensitifitas dan spesifitas dari yang telah dimiliki oleh KCKT<sup>(47)</sup>. Vyncht dkk. (2002) menganalisis multi residu FQ di dalam ginjal babi dan memperoleh nilai LOD yang jauh lebih kecil dari batas residu maksimum (BMR) yang dianalisis dengan menggunakan KCKT. Metode KC-MS digunakan untuk analisis senyawa yang sangat polar, tidak tahan panas dan memiliki berat molekul yang relative besar<sup>(57)</sup>.

KC-MS/MS merupakan pengembangan dari KC-MS yang memiliki sensitifitas dan spesifitas yang jauh lebih baik dan tinggi dibandingkan dengan KCKT dan KC-MS, yang digunakan untuk menentukan multi residu FQ di dalam makanan. Toussaint dkk. (2005) menggunakan KC-MS/MS untuk mendeteksi 11 FQ yang terdapat di dalam ginjal babi dan memperoleh nilai LOQ ( $1-7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) dan LOD ( $0,3-2,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan nilai BMR ( $200-1500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) yang dipersyaratkan.

### **3.3 Kromatografi Gas / Spektrofotometri Massa (GC/MS)**

Karena FQs relatif polar dan tidak mudah menguap derivatisasi harus dilakukan sebelum dianalisis menggunakan GC. Metode derivatisasi yang paling umum digunakan adalah reduksi dengan  $\text{NaBH}_4$  untuk membuat senyawa lebih mudah menguap. Kebanyakan peneliti menggunakan kolom DB-5 atau yang setara untuk proses pemisahan pada suhu 100 hingga  $270^\circ\text{C}$ . Seringkali pendeteksian senyawa dibantu dengan MS dalam modus ion positif dan pemantauan dilakukan dengan modus *selective ion monitoring* (SIM). GC-MS digunakan sebagai alat konfirmasi setelah ditentukan oleh *liquid chromatography-fluorescence detector* (LC-FLD) dan juga untuk kuantifikasi analit<sup>(21)</sup>. Takatsuki (1991) mengembangkan metode GC untuk menganalisis asam nalidixat, asam oksolinat dan asam piromidat di dalam ikan dan makanan asal hewan, menghasilkan sensitifitas yang sangat baik dengan nilai LOD  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

### **3.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT)**

KLT dan KLTKL telah berhasil dikembangkan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap multi residu di dalam produk makanan<sup>(47)</sup>. Metode ini berdasarkan prinsip kromatografi yang diikuti dengan visualisasi dari komponen yang dipisahkan menggunakan pereaksi warna atau pencahayaan dengan sinar UV<sup>(47)</sup>. *Native fluorescence*, *indirect fluorescence* dan *terbium sensitized luminescence* adalah beberapa sistem deteksi yang digunakan dalam metode ini<sup>(21)</sup>. Intensitas relatif dari bercak di atas *plate* dapat diukur menggunakan standar internal dengan *scanning* densitometri untuk analisis kuantitatif<sup>(47)</sup>.

Keuntungan dari metoda ini adalah kapasitas analisis yang tinggi dan sampel yang dipisahkan dapat digunakan untuk konfirmasi lebih lanjut. Akan tetapi kelemahan metode ini adalah memerlukan personil yang berpengalaman dan terampil, persiapan sampel yang sangat ekstensif sehingga waktu analisis lebih lama.

Metode ini digunakan untuk mendeteksi beberapa residu FQ, seperti residu flumekuin di dalam susu<sup>(11)</sup>, siprofloksasin, danofloksasin, enrofloksasin, flumekuin, asam nalidixat, norfloksasin dan asam oksolinat di dalam daging babi<sup>(18)</sup> serta flumekuin dan asam oksilinat di dalam jaringan otot ikan<sup>(52)</sup>. Gaugain *and* Abjean (1998) menganalisis tujuh FQ secara bersamaan di dalam daging babi dan mengembangkan metode ini, diperoleh nilai LOD 0,96  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Vega dkk. (1995) menganalisis kandungan flumekuin dan asam oksilinat di dalam jaringan otot dan ikan masing-masing dengan nilai LOD 0,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dan 8-9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Metode KLT-*bioautography* adalah metode pengembangan KLT yang merupakan kombinasi KLT dan deteksi mikrobiologi untuk mendeteksi flumekuin dalam susu dengan sensitifitas yang lebih baik<sup>(11)</sup>.

#### **4 Metode Bioanalisis**

Metode bioanalisis merupakan pengujian hayati yang melibatkan interaksi atau ikatan antara antigen dan antibodi, yang umumnya digunakan untuk mendeteksi kontaminan yang memiliki berat molekul kecil, seperti kontaminasi atau residu obat hewan di dalam makanan. Bioanalisis memainkan peranan penting untuk menjamin keamanan pangan dengan meningkatnya jumlah kontaminan di dalam produk makanan. Saat ini metode bioanalisis dijadikan sebagai alternatif metode instrumentasi kimia untuk deteksi residu fluorokuinolon karena memiliki kelebihan seperti pengerjaan sederhana dan tidak memerlukan persiapan sampel yang intensif sehingga waktu analisis lebih cepat serta biaya analisis lebih murah karena tidak membutuhkan instrumen atau alat ukur analisis yang sangat mahal.

Berikut beberapa metode bioanalisis yang diaplikasikan oleh peneliti untuk deteksi residu fluorokuinolon dalam komoditi makanan, seperti *immunochromatography*<sup>(45, 55, 62)</sup>, *immunosensors*<sup>(6,19,38,20,27)</sup>, dan *high performance immunoaffinity chromatography (HPIAC)*<sup>(22,23,24,25,60)</sup>.

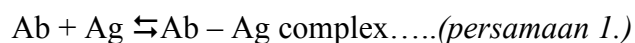
##### **4.1 Immunoassay**

*Immunoassay* bekerja berdasarkan spesifisitas reaksi antara antigen dan antibodi. Karena memiliki kemampuan untuk menganalisis analit dalam konsentrasi rendah, metode ini sangat berguna untuk pemantauan lingkungan dan analisis keamanan pangan dimana

kontaminan atau residu biasanya ada dalam jumlah yang sangat kecil dan tidak dapat dideteksi secara akurat dengan metode konvensional <sup>(47)</sup>.

Kelebihan metode *immunoassay* antara lain adalah cepat, sederhana dan ekonomis) dengan sensitifitas dan spesifisitas yang sebanding atau lebih baik (dalam beberapa hal) dari pada metode instrumentasi. Salah satu kelebihan utama *immunoassay* adalah kecepatan analisis. Hal ini dikarenakan *immunoassay* tidak membutuhkan tahapan persiapan sampel yang melelahkan, seperti menghilangkan senyawa pengganggu dan dapat menganalisis berbagai sampel secara bersamaan <sup>(33)</sup>.

Elektrifitas spesifisitas merupakan faktor yang tergantung terhadap sifat pelengkap dari sebuah permukaan antigen dan sebuah tempat ikatan antibodi (*antibody binding site*). Faktor ini mengatur spesifisitas dari suatu *immunoassay*. Ikatan atau afinitas konstan (*affinity constant*,  $K_{eq}$ ) adalah rasio antigen dan antibodi yang terikat maupun yang tidak terikat (bebas) dalam suatu keseimbangan yang ditunjukkan dalam persamaan 1, yang merupakan tolak ukur seberapa baik suatu antibodi bekerja dalam *immunoassay*. Nilai  $K_{eq}$  untuk *immunoassay* berdasarkan kontaminasi dalam makanan adalah antara hingga  $10^{-4}$  hingga  $10^{-12}$  L/mol <sup>(33)</sup>



$$K_{eq} (\text{Lmol}^{-1}) = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]}$$

Ab = antibodi

Ag = antigen

$K_{eq}$  = *equilibrium constant* atau *affinity constant*

[Ab - Ag] = konsentrasi antigen terikat

[Ab] = konsentrasi antibody bebas

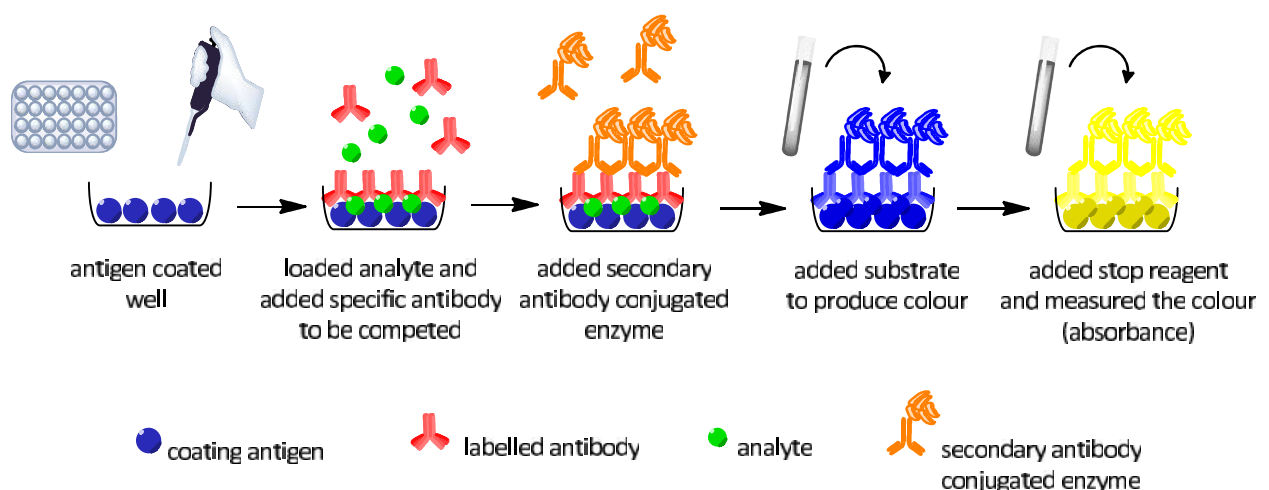
[Ag] = konsentrasi antigen bebas

*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) merupakan salah satu metode yang menerapkan metode *immunoassay*, dimana sistem deteksinya berdasarkan reaksi enzimatik, melibatkan protein yang mengkatalisis suatu reaksi biokimia dan antibodi atau antigen sebagai molekul imunologik <sup>(50)</sup>. ELISA membutuhkan tahapan penambahan dan reaksi reagensia ke dalam suatu senyawa terikat fase padat (*solid phase bound substance*), melalui inkubasi dan pemisahan molekul terikat dan bebas menggunakan tahapan pencucian. Reaksi enzimatik digunakan untuk menghasilkan warna dan analisis kuantifikasi. ELISA telah banyak digunakan untuk analisis fluorokuinolon residu dalam daging <sup>(5,32,34)</sup>, jaringan hewan yang dapat dimakan (*animal edible tissues*) <sup>(15,55,27,62)</sup>, susu <sup>(4,13,15,26,32,60)</sup>, telur <sup>(27,54)</sup>, udang <sup>(46,54)</sup> dan belut <sup>(6)</sup>.

*Competitive ELISA* secara luas digunakan untuk mendeteksi kontaminan dengan berat molekul kecil di dalam makanan seperti, mikotoksin, pestisida dan antibiotik. *Competitive ELISA* terdiri dari *direct competitive ELISA*, dimana antibodi diimmobilisasi (difiksasi/dilekatkan) di atas fase solid (*plate*) dan *indirect competitive ELISA*, dimana hapten atau antigen yang diimmobilisasi di atas fase solid. Sedangkan *non-competitive ELISA* adalah dimana antigen difiksasi di atas fase solid kemudian antibodi berlabel (*labeled antibody*) ditambahkan untuk berikatan. Hasil dari *non-competitive ELISA* secara langsung sebanding dengan konsentrasi antigen. Ini karena antibodi berlabel tidak akan mengikat jika antigen tidak ada di dalam sampel yang tidak diketahui <sup>(41)</sup>.

ELISA kompetisi langsung (*direct competitive ELISA*) berkenaan dengan pengujian yang mana antibodi dilekatkan pada sebuah fase solid. Kemudian, analit dan *enzyme-labelled competing antigen* ditambahkan secara bersamaan untuk bersaing dengan bagian perlekatan antibodi yang terbatas (*limited antibody binding sites*). Setelah inkubasi, setiap reagen yang tidak terikat dihilangkan dengan pencucian. Selanjutnya, larutan substrat ditambahkan untuk menghasilkan warna.

Pada ELISA kompetisi tidak langsung (*indirect competitive ELISA*) dapat dijelaskan dan terlihat pada gambar 2. Prinsip kerja dari metode ini adalah dimana antigen yang dilekatkan pada sebuah fase solid. Setelah pencucian, analit dan antibodi ditambahkan secara bersamaan. *Secondary labelled antibody* digunakan untuk mendeteksi antibodi primer yang telah berikatan dengan antigen pada fase solid. Setelah inkubasi dan pencucian, larutan substrat ditambahkan untuk menghasilkan warna.



Gambar 2. Skematik prinsip kerja dari *indirect competitive ELISA*

Keuntungan utama dari ELISA kompetisi adalah kemampuan untuk menyediakan ikatan yang spesifik dari sebuah antigen dan antibodi dalam *crude* sampel. Sebagai contoh

bahwa matrik pengganggu yang ada di dalam *crude* sampel umumnya tidak mempengaruhi kemampuan antibodi untuk mengikat antigen. Tabel berikut ini menunjukkan metode ELISA yang dikembangkan untuk mendeteksi residu antibiotik FQ di dalam makanan asal hewan.

Tabel Metode ELISA yang dikembangkan untuk residu antibiotik FQ

<b>*Antibiotik FQ</b>	<b>LOD dalam <math>\mu\text{g kg}^{-1}</math> atau <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b><i>Sensitivity</i> (<math>\text{IC}_{50}</math>) dalam <math>\mu\text{g kg}^{-1}</math> atau <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>Sampel</b>	<b>Pustaka</b>
SAR, DIF, TRO, NOR, ENR, NAL	2	7,3 – 48,3	Hati ayam	24
CIP	0.32	n/a*	Susu, daging ayam, babi	15
ENR, CIP, OFL	0,3 – 0,95	2 – 6	Ginjal ayam, susu	4
OFL, DAN, FLU, NAL, OXO, ENO, LOM	0,21	0,21 – 25	Ginjal dan daging babi, telur, ikan, udang	27
GAT	0,05	2,6	Susu	60
ENR	0,7	n/a*	Susu	32
FLU	12,5	90	Susu	13
CIP	0,095	1,47	Susu	26
CIP, ENR, NOR, OFL, DAN, PEF, AMI, LOM, ENO, FLU, OXO, MAR, DIF, SAR	0,2 – 3,4	2,1 – 23	Hati dan daging ayam, telur, udang, madu	54
NOR, ENR, CIP, DIF, SAR, OFL, DAN, FLU, NAL, OXO	0,1 – 17	n/a*	Udang	46
NOR, ENR, CIP, DIF, PEF, CIN, SAR, MAR, OFL, DAN, FLU, NAL, OXO, ENO, LOM, PIP, ORB	0,01	0,04 – 10,2	Daging babi dan ayam	34
PEF, FLE, ENR, OFL, ENO, NOR, LOM, CIP, SAR, GAT, PIP	0,16	6,7	hati ayam, daging sapi dan babi	35
MAR, OFL, ENR, CIP, DIF	0,6	4,6	Daging sapi dan babi	42
DAN, ENR, CIP, DIF, NOR, MAR, OFL, OXO, FLU	0,1	5,4	daging ayam, sapi dan babi	43
ENR, CIP, NOR, OFL, SAR, ENO, LEV, SPA, PEF	2,5	8,3	Daging ayam	8

*\*nama lengkap obat-obat fluorokuinolon tertera didaftar singkatan*

#### **4.2. Immunoaffinity Chromatography (IAC)**

IAC memerlukan ekstraksi sampel dan pemurnian sebelum analisis. Ekstrak yang dihasilkan dapat dihubungkan dengan metode imunokimia atau instrumentasi. Sol-gel IAC adalah sebuah metode dimana antibodi-antibodi terperangkap di dalam sebuah  $\text{SiO}_2$  *sol-gel matrix* untuk mengikat target analit dalam sampel, dan sampel dimasukkan ke dalam sebuah *sol-gel based immunoaffinity purification (IAP) column*. Tahapan elusi melepaskan analit dari ikatan antibodi dan analit kemudian dapat dideteksi menggunakan immunoassay atau instrument<sup>(50)</sup>. Keuntungan dari metode ini menggunakan sejumlah kecil pelarut organik dan sampel yang dibutuhkan, oleh karena itu sangat efektif dalam menghilangkan komponen pengganggu dan menghasilkan nilai perolehan kembali yang tinggi.

IAC telah diaplikasikan oleh banyak peneliti untuk mendeteksi residu FQ di dalam makanan<sup>(23,45,55,60)</sup>. Zhao dkk. (2009) telah berhasil mengembangkan metode IAC yang dihubungkan dengan HPLC yang dilengkapi dengan detektor fluoresens untuk isolasi dan purifikasi 10 FQ di dalam daging ayam. Metode ini memberikan LOD  $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$  untuk danofloxacin and  $0,15 \mu\text{g kg}^{-1}$  untuk semua FQ yang diuji. Penelitian lain menggunakan metode menunjukkan nilai perolehan kembali yang tinggi terhadap sampel hati ayam, daging ayam dan susu, dengan nilai masing-masing 77-96%, 72-92% and 84-99%<sup>(55)</sup>.

#### **4.3 Biosensors/ Immunosensors**

Biosensor merupakan sebuah metode yang terdiri dari elemen pengenalan (*recognition element*), seperti antibodi dan *transducer* yang mengkonversi ikatan dari sebuah antibodi dengan sebuah antigen menjadi sinyal fisik yang dapat terukur (*measureable physical signal*). Sistem tersebut mampu mendeteksi analit secara kontinyu dan selektif, menghasilkan sebuah respon dalam waktu nyata (*real time*)<sup>(50)</sup>. Beberapa tipe dari immunosensor telah digunakan untuk mendeteksi pestisida dan residu FQ di dalam makanan, termasuk *optical, evanescent wave, surface-plasmon resonance, fluorescence and electrochemical impedance spectroscopy*<sup>(6,19,38,50)</sup>.

Metode ini memberikan produktifitas yang lebih tinggi dan waktu kerja yang lebih singkat, yang dapat menganalisis *multiple* residu dalam satu kali analisis sampai dengan 120 sampel per jam<sup>(47)</sup>. Metode ini juga memiliki LOD yang sangat kecil yaitu  $1 \times 10^{-12} \text{g mL}^{-1}$  or  $3 \text{pmol L}^{-1}$ , dimana sinyal dideteksi dan dikarakterisasi dengan *electrochemical impedance spectroscopy*<sup>(19)</sup>. Kekurangan dari metode ini dimana komersial *biochip array* yang tersedia masih terbatas dan memerlukan biaya operasional yang sangat tinggi untuk

Cao dkk. (2007) mengembangkan *DNA-based surface plasmon resonance biosensor* untuk mendeteksi residu ENR di dalam sampel susu. Metode ini bekerja jika denaturasi DNA panas diimobilisasi pada permukaan gelas dilapisi emas (*the gold-coated glass surface*). Imobilisasi dilakukan oleh *layer-by-layer co-deposition* dengan sebuah *cationic polymer*. Kinerja sensor diuji dengan *real biological probes*. LOD yang dihasilkan oleh sensor ini adalah  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  untuk susu. *Plasma resonance biosensor* lain yang dikembangkan untuk residu FQ mampu menghasilkan nilai  $\text{IC}_{50}$  antara  $2\text{-}10 \mu\text{g L}^{-1}$  dan % *cross-reactivity (CR)* 30 hingga 100% terhadap lima residu FQs dalam daging ayam <sup>(38)</sup>.

## 5. Kesimpulan

Metode instrumentasi kimia dan *immunoassay* merupakan metode yang sering digunakan untuk menganalisis, mendeteksi dan mengkuantifikasi residu antibiotik, khususnya antibiotik golongan fluorokuinolon di dalam makanan asal hewan dan laut, yang memiliki spesifisitas dan sensitifitas dan yang tinggi. Kedua metode analisis ini sangat bermanfaat dalam membantu kegiatan pemantauan residu antibiotik fluorokuinolon di dalam makanan asal hewan dan laut di Indonesia, guna menjamin makanan yang aman dan sehat untuk masyarakat.

## 6. Daftar Singkatan (*abbreviation*)

AMI	Amifloksasin	LEV	Levofloksasin
NAL	Asam nalidiksat	LOM	Lomefloksasin
OXO	Asam oksolinat	MAR	Marbofloksasin
PIP	Asam pipemidik	NOR	Norfloksasin
CIN	Cinoksasin	OFL	Ofloksasin
DAN	Danofloksasin	ORB	Orbifloksasin
DIF	Difloksasin	PEF	Pefloksasin
ENO	Enoksasin	SAR	Sarafloksasin
ENR	Enrofloksasin	CIP	Siprofloksasin
FLE	Fleroksasin	SPA	Sparfloksasin
FLU	Flumekuin	TRO	Trovafloksasin
GAT	Gatifloksasin		

## 7. Daftar Pustaka

1. **Beier RC. & Stanker LH.** 1996. *Immunoassays for Residue Analysis*,. *American Chemical Society*. Washington DC., USA. 1996.
2. **Blondeau JM.** 2004. Fluoroquinolones: Mechanis of Action, Classification, and Development of Resistance. *Survey of Ophthalmology*, 49, 73-78.

3. **Brown SA.** 1996. Fluoroquinolones in Animal Health. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*, 19.
4. **Bucknall S, Silverlight J, Coldham N, Thorne L. & Jackman R.** 2003. Antibodies to the Quinolones and Fluoroquinolones for the Development of Generic and Specific Immunoassays for Detection of these Residues in Animal Products. *Journal of Food Additives and Contaminants* 20, 221-228.
5. **Burkin MA.** 2008. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Of Fluoroquinolones with Selective and Group Specificities. *Journal of Food and Agricultural Immunology*, 19, 131-140.
6. **Cao L, Lin H. & Mirsky VM.** 2007. Surface Plasmon Resonance Biosensor for ENR Based On Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Analytica Chimica Acta*, 589, 1-5.
7. **Carlucci G.** 1998. Analysis of Fluoroquinolones in Biological Fluids By High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 812, 343-367.
8. **Chen J, Xu F, Jiang H, Hou Y, Rao Q, Guo P. & Ding S.** 2009. A Novel Quantum Dot-Based Fluoroimmunoassay Method for Detection Of ENR Residue in Chicken Muscle Tissue. *Food Chemistry*, 113, 1197-1201.
9. **Choma I, Grenda D, Malinowska I. & Supryniewicz Z.** 1999. Determination of Flumequine and Doxycycline in Milk By A Simple Thin-Layer Chromatographic Method. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences And Applications*, 734, 7-14.
10. **Choma IM, Choma A, Komaniecka I, Pilorz K. & Staszczuk K.** 2004. Semiquantitative Estimation of ENR And Ciprofloxacin by Thin-Layer Chromatography - Direct Bioautography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 27, 2071-2085.
11. **Choma IM, Choma A. & Staszczuk K.** 2002. Determination of Flumequine in Milk by Thin-Layer Chromatography-Bioautography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25, 1579 - 1587.
12. **Cinquina AL, Roberti P, Giannetti L, Longo F, Draisci R, Fagiolo A. & Brizioli NR.** 2003. Determination of ENR and Its Metabolite Ciprofloxacin in Goat Milk by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection: Optimization and Validation. *Journal of Chromatography A*, 987, 221-226.
13. **Coillie EV, Block JD. & Reybroeck, W.** 2004. Development of An Indirect Competitive Elisa for Flumequine Residues in Raw Milk Using Chicken Egg Yolk Antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4975-4978.
14. **Dufresne G, Fouquet A, Forsyth D. & Tittlemier, SA.** 2007. Multiresidue Determination of Quinolone and Fluoroquinolone Antibiotics in Fish and Shrimp by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 90, 604-612.

15. **Duan J. & Yuan Z.** 2001. Development of An Indirect Competitive ELISA for Ciprofloxacin Residues in Food Animal Edible Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1087-1089.
16. **Espinosa-Mansilla A, De La Pena AM, Gomez DG. & Lopez FS.** 2006. Determination of Fluoroquinolones in Urine and Serum by Using High Performance Liquid Chromatography and Multiemission Scan Fluorimetric Detection. *Journal of Talanta* 68, 1215-1221.
17. **Fierens C, Hillaert S. & Van Den Bossche W.** 2000. The Qualitative And Quantitative Determination of Quinolones of First And Second Generation by Capillary Electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 763-772.
18. **Gaugin M. & Abjean JP.** 1998. Screening of Quinolone Residues in Pig Muscle by Planar Chromatography. *Journal of Chromatographia*, 47 (1-2), 101-104.
19. **Giroud F, Gorgy K, Gondran C, Cosnier S, Pinacho DG, Marco MP. & Sanchez-Baeza FJ.** 2009. Impedimetric Immunosensor Based on A Polypyrrole-Antibiotic Model Film for The Label-Free Picomolar Detection Of Ciprofloxacin. *Analytical Chemistry*, 81, 8405–8409.
20. **Haasnoot W, Gercek H, Cazemier G. & Nielen MWF.** 2007. Biosensor Immunoassay for Flumequine in Broiler Serum and Muscle. *Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), 312-318.
21. **Hernandez-Arteseros JA, Barbosa J, Compano R. & Prat MD.** 2002. Analysis of Quinolone Residues in Edible Animal Products. *Journal Of Chromatography*, 945, 1-24.
22. **Holtzapple CK, Buckley SA. & Stanker LH.** 1999. Determination of Four Fluoroquinolones in Milk By On-Line Immunoaffinity Capture Coupled with Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*, 82, 607-613.
23. **Holtzapple CK, Buckley SA. & Stanker LH.** 2001. Determination of Fluoroquinolones in Serum Using an On-Line Clean-Up Column Coupled to High-Performance Immunoaffinity–Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 754, 1-9.
24. **Holtzapple CK, Pishko EJ. & Stanker LH.** 2000. Separation and Quantification of Two Fluoroquinolones in Serum by On-Line High-Performance Immunoaffinity Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 72, 4148-4153.
25. **Holtzapple CK. & Stanker LH.** 1998. Affinity Selection of Compounds in a Fluoroquinolone Chemical Library By On-Line Immunoaffinity Deletion Coupled to Column HPLC. *Analytical Chemistry*, 70, 4817-4821.
26. **Huang B, Yin Y, Lu L, Ding H, Wang L, Yu T, Zhu JJ, Zheng XD. & Zhang YZ.** 2010. Preparation of High-Affinity Rabbit Monoclonal Antibodies for Ciprofloxacin

and Development of An Indirect Competitive Elisa for Residues in Milk. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 11(10), 812-818.

27. **Huet AC, Charlier C, Singh G, Godefroy SB, Leivo J, Vehniäinen M, Nielen MWF, Weigel S. & Delahauta P.** 2008. Development of an Optical Surface Plasmon Resonance Biosensor Assay For (Fluoro)Quinolones In Egg, Fish, And Poultry Meat. *Analytica Chimica Acta*, 623, 195–203.
28. **Hung S.** 2007. New Detection Technique for Fluoroquinolone-Conjugated Proteins by High Performance Liquid Chromatography with UV/Fluorescence Detectors. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15, 71-74.
29. **Idowu OR. & Peggins JO.** 2004. Simple, Rapid Determination of ENR and Ciprofloxacin in Bovine Milk and Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 143-153.
30. **Ikegawa S.** 1998. Separatory Determination of Diastereomeric Ibuprofen Glucuronides in Huma Urine by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of Biomedical Chromatography*, 12, 317-321.
31. **Johnston L, Mackay L. & Croft M.** 2002. Determination of Quinolones and Fluoroquinolones in Fish Tissue and Seafood by High Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography*, 982, 97-109.
32. **Kato M, Ihara Y, Nakata E, Miyazawa M, Sasaki M, Tsukasa K. & Nakazawa H.** 2007. Development of ENR Elisa Using A Monoclonal Antibody Tolerating An Organic Solvent with Broad Cross-Reactivity To Other Newquinolones. *Journal of Food and Agricultural Immunology*, 18, 179-197.
33. **Lee NA. & Kennedy IR.** 2007. Immunoassay, Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Development. *Elsevier, Valencia, Spain*.
34. **Li Y, Ji B, Chen W, Liu C, Peng C. & Wang L.** 2008. Production of New Class-Specific Polyclonal Antibody for Determination of Fluoroquinolone Antibiotics by Indirect Competitive Elisa. *Journal of Food and Agricultural Immunology*, 19, 251-264.
35. **Lu SL, Zhang Y, Liu J, Zhao C, Liu W. & Xi R.** 2006. Preparation of Anti-Pefloxacin Antibody and Development of An Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Pefloxacin Residue in Chicken Liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6995-7000
36. **Maraschiello C, Cusidó E, Abellán M. & Vilageliu J.** 2001. Validation of An Analytical Procedure for the Determination of the Fluoroquinolone Ofloxacin in Chicken Tissues. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences And Applications*, 754, 311-318.

37. **Marazuela MD. & Moreno-Bondi MC.** 2004. Multiresidue Determination of Fluoroquinolones in Milk by Column Liquid Chromatography with Fluorescence and Ultraviolet Absorbance Detection. *Journal of Chromatography A*, 1034, 25-32.
38. **Marchesini GR, Haasnoot W, Delahaut P, Gercek H. & Nielen, MWF.** 2007. Dual Biosensor Immunoassay-Directed Identification of Fluoroquinolones in Chicken Muscle by Liquid Chromatography Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 259–268
39. **Mella MS, Acuña LG, Muñoz QM, Perez CC, Labarca LJ, Gonzalez RG, Bello TH, Dominguez YM. & Zemelman ZR.** 2000. Quinolones: General Characteristics of Structure and Classification. *Quinolonas: Aspectos Generales Sobre Su Estructura Y Clasificación*, 17, 53-66.
40. **Pena A, Silva LJG, Pereira A, Meisel L. & Lino CM.** 2010. Determination of Fluoroquinolone Residues In Poultry Muscle In Portugal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2615-2621.
41. **Price CP. & Newman DJ.** 1991. Principle And Practice of Immunoassay.
42. **Sheng W, Xia X, Wei K, Li J, Li QX. & Xu T.** 2009a. Determination of Marbofloxacin Residues in Beef and Pork with An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5971-5975.
43. **Sheng W, Xua T, Maa H, Wanga X, Li Q. & Li J.** 2009b. Development of An Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Danofloxacin Residues in Beef, Chicken and Pork Meats. *Journal of Food and Agricultural Immunology*, 20, 35-47.
44. **Shim JH, Shen JY, Kim MR, Lee CJ. & Kim IS.** 2003. Determination of The Fluoroquinolone ENR in Edible Chicken Muscle by Supercritical Fluid Extraction And Liquid Chromatography With Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7528-7532.
45. **Sun WY, Liu WY. & Qu LB.** 2007. Development Of ELISA and Immunochromatographic Assay for Ofloxacin. *Chinese Chemical Letters*, 18, 1107-1110.
46. **Tittlemier SA, Gelinas JM, Dufrense G, Haria M, Queery J, Cleroux C, Menard C, Delahaut P, Singh G, Durand N. & Godefroy S.** 2008. Development of A Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for The Detection Of Fluoroquinolone Residues In Shrimp. *Journal Analytical Methods*, 1, 28-35.
47. **Toldra F. & Reig M.** 2006. Methods for Rapid Chemical and Veterinary Drug Residues in Animal Foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 482-489.
48. **Toussaint B, Chedin M, Bordin G. & Rodriguez AR.** 2005a. Determination (Fluoro)Quinolone Antibiotic Residues in Pig Kidney Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: I. Laboratory-Validated Method. *Journal of Chromatography*, 1088(1-2), 32-39.

49. **Toussaint B, Chedin M, Vincent U. & Rodriguez AR.** 2005b. Determination (Fluoro)Quinolone Antibiotic Residues in Pig Kidney Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Part II. Intercomparison Exercise. *Journal of Chromatography*, 1088(1-2), 40-48.
50. **Van Emon JM.** 2010. Bioanalytical Methods for Food Contaminant Analysis. *Journal of AOAC International*, 93 (6), 1681-1691.
51. **Van Vyncht G, Janosi A, Bordin G, Toussaint B, Maghuinrogister G, De Pauw E. & Rodriguez AR.** 2002. Multiresidue Determination of (Fluoro)Quinolone Antibiotics in Swine Kidney Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 952.
52. **Vega M, Rios G, Saelzer R. & Herlitz E.** 1995. Analysis of Quinolonic Antibiotics By HPTLC. Oxolinic Acid Residue Analysis in Fish Tissue. *Journal of Planar Chromatography*, 8, 378-381.
53. **Volmer DA, Mansoori B. & Locke SJ.** 1997. Study Of 4-Quinolone Antibiotics in Biological Samples by Short-Column Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 69, 4143-4155.
54. **Wang S, Allan RD, Skerritt JH. & Kennedy IV.** 1998. Development of A Class-Specific Competitive Elisa For The Benzoylphenylurea Insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (8), 3330-3338.
55. **Watanabe H, Satake A, Kido Y. & Tsuji A.** 2002. Monoclonal-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Assay for ENR in Biological Matrices. *Analyst*, 127, 98-103.
56. **Watanabe H, Satake, Kido Y. & Tsuji A.** 2002. Monoclonal-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Assay for ENR in Biological Matrices. *The Analyst*, 127, 98-103.
57. **Yoon Y, Westerhoff P, Snyder SA. & Esparza M.** 2003. HPLC-Fluorescence Detection and Adsorption of Bisphenol A, 17 $\beta$ -Estradiol, and 17 $\alpha$ -Ethinyl Estradiol on Powdered Activated Carbon. *Water Research*, 37, 3530-3537.
58. **Yorke JC. & Froc P.** 2000. Quantitation of Nine Quinolones in Chicken Tissues By High-Performance Liquid Chromatography with fluorescence Detection, *Journal of Chromatography*, 882, 63-77.
59. **Zeng Z, Dong A, Yang G, Chen Z. & Huang X.** 2005. Simultaneous Determination of Nine Fluoroquinolones in Egg White and Egg Yolk by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, 821, 202-209.
60. **Zhao S, Li X, Ra Y, Li C, Jiang H, Li J, Qu Z, Zhang S, He F, Wan Y, Feng C, Zheng Z. & Shen J.** 2009. Developing and Optimizing An Immunoaffinity Cleanup

Technique for Determination of Quinolones from Chicken Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 365-371.

61. **Zheng Z, Dong AG, Yang GX, Chen ZL. & Huang XH.** 2005. Simultaneous Determination of Nine Fluoroquinolones in Egg White And Egg Yolk by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography*, 821, 202-209.
62. **Zhu Y, Li L, Wang Z, Chen Y, Zhao Z, Zhu L, Wu X, Wan Y, He F. & Shen J.** 2008. Development of An Immunochromatography Strip for the Rapid Detection of 12 Fluoroquinolones in Chicken Muscle and Liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5469-5474.