

PENENTUAN RESIDU ANTIBIOTIKA SALINOMISIN, MONENSIN DAN LASALOSID PADA DAGING AYAM DENGAN METODA BIOAUTOGRAFI/KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (TLC) DAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (HPLC)

Ni Made Ria Isriyanthi, Diana Hermawati, Fajar Sumping Catur Rasa, Sri Werdiningsih, Syamsul Bahri Siregar.
Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotika pada ternak dewasa ini semakin meningkat baik jenis maupun jumlahnya. Salinomisin (SL), Monensin (MN) dan Lasalosid (LS) merupakan antibiotika Polyether yang banyak digunakan untuk pencegahan koksidiosis pada ayam (Wever, 1991) dan sebagai pemacu pertumbuhan berat badan serta dapat meningkatkan efisiensi pakan pada sapi (Anonim, 1987; Martinez dan Shimoda, 1983).

Penggunaan antibiotika harus mengikuti aturan-aturan tertentu untuk mencegah timbulnya efek samping yang dapat membahayakan lingkungan dan masyarakat konsumen produk ternak seperti efek keracunan, mutagenik, karsinogenik, resistensi dan alergi (Arnold, 1991, Lobry, 1990). Residu antibiotika dapat terjadi akibat penggunaan obat antibiotika yang tidak mengikuti aturan dan pada saat ini telah banyak menimbulkan masalah sehingga perlu adanya pengawasan terhadap bahaya yang ditimbulkannya. Penetapan nilai batas maksimum residu yang diijinkan pada ternak merupakan salah satu alternatif untuk dapat dilaksanakan (Anonim, 1984).

Berbagai metoda pemeriksaan residu telah banyak dikembangkan untuk memperoleh hasil yang lebih baik. Beberapa hasil penelitian pengujian residu salinomisin, monensin dan lasalosid masing-masing dengan menggunakan HPLC (High Performance Liquid Chromatography); TLC (Thin Layer Chromatography) dan HPLC; HPLC secara fluorometri dan Gas Kromatografi, telah dilaporkan (Gary dkk, 1984; Martinez dan Shimoda, 1983, 1985; Hoshino dkk, 1985; Horii dkk, 1980; Weiss dan MacDonald, 1985).

Metoda pemeriksaan residu pada produk ternak harus menunjukkan spesifisitas yang tinggi mengingat kompleksnya senyawa-senyawa yang terkandung dalam jaringan yang dapat berikatan dengan antibiotika yang diperiksa sehingga dapat mengaburkan hasil akibat timbulnya reaksi yang positif palsu.

Tujuan penelitian tersebut adalah menganalisa kembali secara *in vitro* SL, MN dan LS yang ditambahkan pada daging ayam dalam jumlah tertentu. Adapun metoda yang digunakan adalah TLC untuk SL, MN dan LS; serta metoda HPLC untuk LS.

MATERI DAN METODA

A. Pelarut dan pereaksi

Sebagai pelarut dan pereaksi digunakan asetonitril, n-hexan, kloroform, etil asetat, metanol, 0,05 N natrium hidroksida dan natrium sulfat anhidrat.

B. Larutan standar antibiotika

Larutan standar antibiotika SL, MN dan LS masing-masing 1000 mcg/ml diencerkan dengan asetonitril sehingga diperoleh larutan standar campuran SL 0,02 ppm; MN 0,05 ppm dan LS 0,05 ppm, yang ditambahkan pada 10 gram daging ayam sebagai kontrol positif.

Larutan standar lainnya adalah SL, MN dan LS masing-masing 1000 mcg/ml diencerkan dengan metanol menjadi larutan standar campuran dengan konsentrasi 10, 20, 40, 80 dan 160 ppm yang akan digunakan pada metoda analisa dengan TLC.

Untuk metoda analisa HPLC, larutan standar SL, MN dan LS 1000 mcg/ml dilarutkan bersamaan ke dalam larutan 90 % metanol (100 mM natirum perklorat) sehingga diperoleh larutan standar campuran dengan kadar 1, 2, 4, 8 dan 16 ppm.

C. Alat dan bahan

1). Kromatografi lapis tipis: Pelat TLC silica (Merck, Art 5721), dengan fasa gerak terdiri dari larutan campuran dietil eter-aseton-larutan amonium 25% (90 + 8 + 2). Medium yang digunakan untuk bioautografi terdiri dari yeast extract 2,5 gram, glukosa 10 gram, magnesium sulfat 50 gram dan bacto agar 15 gram yang dilarutkan dalam air menjadi 1000 ml medium pada pH $6,0 \pm 0,1$ dan kuman uji yang digunakan adalah spora *Bacillus subtilis* ATCC-6633.

2) Kromatografi cair kinerja tinggi: HPLC dengan deteksi fluorometri dan kolom Shim-Pack CLC-ODS berukuran 6,0 x 15 cm sebagai fasa diam. Pengukuran panjang gelombang pada eksitasi 310 nm dan emisi 425 nm. Fasa gerak adalah larutan 90% metanol dalam air dan 100 mM natirum perklorat dengan kecepatan aliran 0,8 ml/menit dan suhu kolom 40°C.

D. Metoda pemeriksaan

1. Ekstraksi dan pemisahan

Daging ayam bebas residu masing-masing 10 gram ditempatkan dalam 2 botol polipropilen (Nalgene) ukuran 250 ml. Untuk botol perlakuan ditambahkan larutan standar antibiotika yang merupakan campuran SL 0,02 ppm, MN 0,05 ppm dan LS 0,05 ppm (kontrol positif), botol lainnya digunakan sebagai kontrol (tanpa antibiotika). Kedua botol masing-masing ditambahkan 100 ml pelarut asetonitril dan dihomogenizer selama 3 menit, kemudian disaring dengan kertas Whatman No. 5. Supernatan dicuci dalam 100 ml n-hexan yang telah dijenuhkan dengan asetonitril dan dikocok selama 10 menit dan disentrifus 3000 rpm selama 10 menit. Lapisan asetonitril diambil dan dievaporasikan pada suhu 40°C sampai kering dan dilarutkan kembali dengan 70 ml 0,05 N natirum hidroksida dan 70 ml kloroform. Larutan dikocok selama 10 menit dan disentrifus

3000 rpm selama 10 menit. Lapisan kloroform dilewatkan pada serbuk natrium sulfat anhidrat dan ditampung dalam labu evaporasi. Larutan dievaporasikan pada suhu 40°C sampai kering dan tambahkan 20 ml kloroform. Larutan tersebut dialirkan ke Sep-pak silica dan dielusi dengan 10 ml etil asetat kloroform (2 + 8) dan buang eluatnya. Selanjutnya dielusi kembali dengan 10 ml metanol-kloroform (1+9). Eluat yang diperoleh ditampung dan dibagi menjadi 2 bagian masing-masing 5 ml dalam 2 buah labu evaporasi. Masing-masing larutan dievaporasikan pada suhu 40°C sampai kering. Untuk pemeriksaan dengan TLC residu dilarutkan kembali dengan 0,1 ml metanol sedangkan untuk pemeriksaan HPLC larutan dengan 0,5 ml metanol 90% dalam air dan 100 mM natirum perklorat.

2. Deteksi antibiotika

a. Metoda TLC

Totolkan 10 µl larutan campuran standar SL, MN dan LS dengan kadar masing-masing 10, 20, 40, 80 dan 160 ppm, dan larutan sampel pada pelat TLC. Kemudian tempatkan pelat TLC dalam bejana kromatografi yang berisi campuran dietil eter aseton-larutan amonium 25% (90 + 8 + 2). Setelah dikembangkan keluarkan pelat TLC dan keringkan pada suhu kamar. Pelat TLC disemprot dengan agar medium 1% sampai merata dan membentuk lapisan tipis. Selanjutnya pelat tersebut diletakkan dalam bejana bioautografi dan tuangkan agar medium yang diinokulasikan dengan kuman uji di atas pelat. Setelah mengering inkubasikan selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Tuangkan 0,05% Indophenyl-2 para nitrophenyl (INT) ke atas pelat TLC, untuk memperjelas penentuan daerah hambatan. Perhitungan kadar zat aktif dalam daging ayam didasarkan pada perbandingan kurva larutan standar dengan kurva sampel.

b. Metoda HPLC

Injeksikan 10 µl larutan standar LS dengan kadar 1, 2, 4, 8 dan 16 ppm dan larutan sampel ke dalam sistem kromatografi cair kinerja tinggi. Pengukuran kurva standar dilakukan dengan

mengukur tinggi puncak kurva dari kromatogram yang dihasilkan. Perhitungan kadar zat aktif dalam daging ayam didasarkan pada perbandingan kurva standar dan kurva sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polyethers adalah kelompok antibiotika yang mempunyai sifat asam, lipophylic, tidak larut dalam air tetapi larut dalam hampir seluruh pelarut organik yang mempunyai polaritas tinggi, sehingga untuk proses ekstraksi digunakan asetonitril sebagai pelarut organik. Lebih lanjut, pemisahan antibiotika dari zat-zat lain yang terkandung dalam jaringan daging ayam digunakan Sep-pak silica dengan eluen yang mempunyai perbedaan polaritas.

Dengan menggunakan pelat TLC silica dan fasa gerak dietil eter - aseton - larutan amonium 25% (90+8+2), proses pemisahan berjalan secara kromatografi fasa normal. Dari hasil diperoleh terlihat bahwa ke tiga komponen mempunyai resolusi pemisahan yang sempurna, dimana migrasi komponen terjadi karena adanya kompetisi antara eluen dengan komponen untuk berikatan dengan sisi-sisi aktif fasa diam.

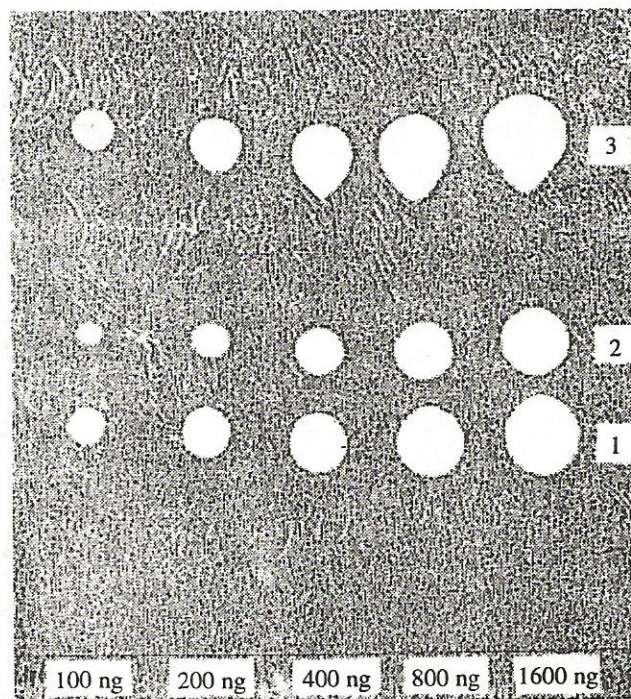


Fig 1. Judgement of mixed standard of salinomisin, monensin and lasalosid by using Thin Layer Chromatography (TLC).

Dengan metoda TLC batas konsentrasi terkecil yang masih dapat dideteksi adalah 100 ng (Gambar 1). Penambahan antibiotika SL 0,02 ppm, MN 0,05 ppm dan LS 0,05 ppm ke dalam daging ayam masing-masing menunjukkan prosentase yang dapat dideteksi kembali (recovery) sebesar $73,90 \pm 1,00\%$; $85,65 \pm 2,17\%$ dan $76,26 \pm 2,30\%$ (Tabel 1).

Table 1. The recovery percentages of SL, MN and LS from chicken meat.

Antibiotik	Added Concentration in meat	Recxovery percentages Value (%)	
		TLC	HPLC
Salinomisin	0.02 ppm	73.90 ± 1.00	—
Monensin	0.05 ppm	85.65 ± 2.17	—
Lasalosid	0.05 ppm	76.26 ± 2.30	75.71 ± 1.20

— : Not done

Penggunaan metoda HPLC dengan kolom Shimpak CLC-ODS memberikan pemisahan yang baik untuk lasalosid dari komponen-komponen lainnya (Gambar 2), dengan waktu retensi sekitar 7 menit dan batas konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi adalah 5 ng. Prosentase nilai perolehan kembali lasalosid dalam daging ayam pada penambahan 0,05 ppm adalah $75,71 \pm 1,20\%$ (Tabel 1).

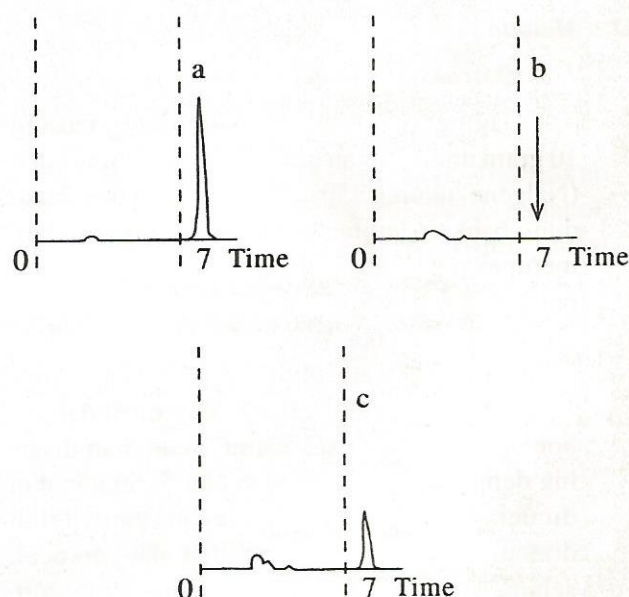


Fig 2. Type of Chromatogram (HPLC)

- Standard solution of lasalosid (10 ng)
- Blank sample solution
- Standard solution of lasalosid being added to meat (5 ng).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous.** 1984. Report of a joint FAO/WHO consultation of Residues of Veterinary drugs in Foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Anonymous.** 1987. Ringkasan Imbuhan Pakan (Feed Additive) untuk hewan. Departemen Pertanian, Direktorat Jenderal Peternakan, Direktorat Kesehatan Hewan. Edisi I : 8-10.
- Arnold, D.** 1991. Consequences for animal and public health of presence of chemical residues (drugs, hormon and pesticides) in animal and animal products. 6th Meeting of the OIE expert group on veterinary drug registration; Office International des Epizooties, Paris : 1-28.
- Dimenna, G.P., Creegan, J.A., Trunbull, L.B. and Wright, G.J.,** 1987. Liquid chromatographic determination of salinomycin sodium in feed premix and biomass samples. J. Assoc Off Anal Chem, 70 : 504-506.
- Horii, S., Miyahara, K. and Momma, C.,** 1990. High performance liquid chromatographic determination of lasalosisid sodium in chicken tissue. Journal of liquid chromatography, 13 : 1411-1417.
- Hoshino, Y., M. Horie, N. Nose and H. Iwasaki.** 1985. Determination of monensin in chicken meat by high performance liquid chromatography. J. of Food hygienic society of Japan, 26 : 585-590.
- Lobry, M.** 1990. OIE activities related to veterinary drug registration. Present situation on veterinary drug registration in EEC countries. FAO/APHCA regional workshop on registration, certification and quality control on veterinary biologics, Bogor, West Java, Indonesia.
- Martinez, E.E. and Shimoda, W.** 1983. Identification and semiquantitation of monensin sodium in animal feed by thin layer bioautography. J. Assoc. Off Anal. Chem, 66 : 1506-1509.
- Martinez, E.E. and Shimoda, W.** 1985. Determination of monensin sodium residues in beef liver tissue by liquid chromatography of a fluorescent derivative. J. Assoc. Off. Anal Chem, 68 : 1149 - 1153.
- Weiss, G. and MacDonalds, A.** 1985. Methods for determination of Ionophore-type antibiotic residues in animal tissues. J. Assoc. Off. Anal. chem, 68 : 971-980.
- Wever, G.M.** 1991. The efficacy of lasalosisid (Avatec) against a mixed *Coccidia* Field Isolate under normal and Restricted Feeding Regiments. Roche Symposium on Animal Nutrition and Health. Basel/Village Neuf : 139.

DETERMINATION OF SALINOMYCINE MONENSIN AND LASALOSID RESIDUES IN CHICKEN MEAT BY USING BIOAUTOGRAHY AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATIGRAPHY

SUMMARY

A bioutography procedure was conducted to determine the residue of salinomycin (SL), monensin (MN) and lasalosisid (LS). SL, MN and LS were extracted from chicken meat by homogenizing with acetonitrile and purified by silica cartridge column. The aliquots were spotted on thin layer plate and detected by bioautography. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was used as test microorganisms. The percentage of average recoveries of residues from chicken meat found at the level of SL 0.02 ppm, NM 0.05 ppm and LS 0.05 ppm were $73.90 \pm 1.00\%$, $85.65 \pm 2.17\%$ and $76.26 \pm 2.30\%$, respectively.

A high performance liquid chromatography (HPLC) method with fluoremetric detector was used to determine the residue of LS in chicken meat. The method of extraction was conducted as describe before. The aliquots were separated by HPLC using an ODS column. The percentage of average recoveries of LS at the level of 0.05 ppm was $75.71 \pm 1.20\%$

There was no differences between the percentage of average recovery of LS at the level of 0.05 ppm wheather using HPLC or TLC.