

**ANALISIS CHLORAMPHENICOL PADA UDANG WINDU (*Penaeus Monodon*)
SECARA SPEKTROFOTOMETRI BERBASIS REAKSI DIAZOTASI**

**SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF CHLORAMPHENICOL IN TIGER PRAWNS
(*Penaeus Monodon*) BASED ON THE DIAZOTATION REACTION**

Moh Syaiful Arif*, Indra Kurniawan, Bohari Yusuf

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

*Corresponding Author : syaifularif88@gmail.com

Submitted : 09 Agustus 2021

Accepted : 15 Maret 2023

Publish : 25 Mei 2023

ABSTRAK

Analisis *chloramphenicol* pada udang windu (*Penaeus Monodon*) secara spektrofotometri berbasis reaksi diazotasi telah dilakukan. Sulfanilamid dapat digunakan sebagai sumber garam diazo yang dikopling dengan *chloramphenicol*. Pada penelitian ini dilakukan beberapa optimasi seperti optimasi suhu, volume HCl, volume NaNO₂, volume sulfanilamid dan waktu kontak. Garam diazonium yang dikopling dengan sulfanilamid menghasilkan senyawa berwarna kuning jernih dengan panjang gelombang maksimum 400,941 nm. Hasil pengujian *chloramphenicol* pada udang windu, diperoleh nilai koefisien variasi sebesar 4,026 %; 1,950 %; dan 4,277 %. Nilai akurasi pada rentang 99,7143% sampai 100,8730%. Nilai limit deteksi sebesar 6,24 µg/mL dan nilai limit kuantisasi sebesar 20,803 µg/mL. Nilai sensitivitas sebesar 0,0021 mL/µg.

Kata kunci : udang windu, *chloramphenicol* dan reaksi diazotasi.

ABSTRACT

Spectrophotometric analysis of chloramphenicol in tiger prawns (*Penaeus Monodon*) based on the diazotation reaction has been carried out. Sulfanilamide is used as a source of diazo salt to be coupled with chloramphenicol. In this study, several optimizations were carried out such as optimization of temperature, volume of HCl, volume of NaNO₂, volume of sulfanilamide and contact time. Diazonium salt coupled with sulfanilamide produces a clear yellow compound with a maximum wavelength of 400.941 nm. The results of the analysis chloramphenicol on tiger shrimp, obtained the coefficient of variation were 4.026 %; 1.951 %; and 4.277 %. Accuracy ranges from 99.7143% to 100.8730%. The Limit of Detection value is 6.24 mg/mL and the Limit of Quantization value was 20.803 mg/mL. The sensitivity value is 0.0021 mL /µg.

Keywords : Tiger prawns, chloramphenicol and reaction diazotation.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

PENDAHULUAN

Negara Indonesia yang merupakan negara maritim membuat sebagian masyarakatnya bermata pencaharian sebagai nelayan ataupun budidaya, salah satu budidaya yang banyak dikembangkan ialah udang windu. Sejak sekitar tahun 1980 budidaya udang sudah berkembang sebagai usaha industri, namun masih terdapat beberapa kendala penyakit pada hewan ternak atau udang dikarenakan organisme patogen yang mengakibatkan kematian pada udang atau hewan ternak[1]. Antibiotik *chloramphenicol* sering kali ditambahkan atau dicampurkan untuk mengendalikan penyakit pada udang utamanya yang disebabkan oleh bakteri.

Chloramphenicol merupakan golongan antibiotika *amphenicol* yang mempunyai sifat bakteriostatik, selain itu *chloramphenicol* juga memiliki aktifitas yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Selain digunakan untuk pengobatan pada udang, fungsi lain *chloramphenicol* seringkali digunakan sebagai desinfektan sebelum produk udang tersebut diproses dan juga untuk pembilasan kolam pada saat proses produksi[2]. Penggunaan antibiotik yang kurang tepat pada hewan ternak berpotensi terbentuknya residu pada jaringan organ hewan ternak. Residu *chloramphenicol* yang terdapat pada udang atau hewan ternak cukup berbahaya untuk kesehatan manusia yang mengkonsumsinya, sehingga menyebabkan alergi, keracunan, resistensi antibiotik jika dikonsumsi dalam waktu lama dan jumlah yang besar. Oleh karena itu antibiotik tidak boleh ditambahkan pada pakan hewan[3].

Pemerintah *United Kingdom* mengatur tentang batasan konsentrasi yang dianjurkan tentang kandungan residu *chloramphenicol* dalam makanan yang diperbolehkan adalah kurang dari 10 ppb. Sedangkan batas aman konsentrasi *chloramphenicol* pada tubuh hewan yaitu maksimum 0,3 ppb. Lebih daripada itu maka hewan tidak boleh dikonsumsi karena akan memberikan dampak berbahaya bagi kesehatan manusia. Dampak negatif yang ditimbulkan *chloramphenicol* dalam jangka waktu yang lama dan berlebihan kadarnya dapat mengakibatkan penyakit anemia aplastik, trombositopenia, aplastik, dan granulositopenia. Penyakit tersebut dipicu karena depresi sumsum tulang belakang sehingga menimbulkan kelainan darah. Selain mengakibatkan kelainan darah *chloramphenicol* juga dapat menyebabkan hipersensitivitas dan gangguan [4].

Berdasarkan pemaparan di atas, maka perlu dilakukan analisa *chloramphenicol* pada udang windu yang akan dijual ke konsumen dengan metode yang cepat, mudah dan murah sehingga diketahui kadar *chloramphenicol* pada udang windu yang akan dipasarkan.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Pada penelitian ini digunakan beberapa alat yaitu labu takar, pipet volume, gelas ukur, *erlenmeyer*, kaca arloji, gelas corong, pipet tetes, *sentrifuge*, pipet ukur, *hotplate stirrer*, neraca analitik, spatula kaca, spektrofotometer Uv-Vis *evolution 201*, gelas kimia, botol semprot, *thermometer*, dan *vortex mixer*.

Bahan

Semua reagen yang dalam penelitian ini berderajat pro analisis. Pada penelitian ini digunakan bahan-bahan sebagai berikut: garam, es batu, HCl (asam klorida), sulfanilamid (Merck), natrium nitrit (Merck), etanol, *aquades*, dan asam trikloroasetat.

Prosedur Penelitian

Larutan induk *chloramphenicol* 1000 ppm

Ditimbang 0,01 gram *chloramphenicol* kemudian dimasukkan gelas kimia 50 mL, dan tambahkan pelarut etanol serta diaduk sampai larut sempurna. Larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan etanol sampai tera, dikocok hingga tercampur sempurna.

Larutan asam sulfanilamid 0,3%

Ditimbang 0,3 gram sulfanilamid dilarutkan dengan *aquades* pada gelas kimia 50 mL dan diaduk sampai larut sempurna. Larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan *aquades* sampai tanda tera.

Larutan natrium nitrit 1%

Ditimbang 1,0 gram natrium nitrit dilarutkan dengan *aquades* dalam gelas kimia 50 mL dan diaduk sampai natrium nitrit larut sempurna. Larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan diencerkan sampai tanda tera menggunakan *aquades*.

Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

Ditimbang 1,0 gram asam trikloroasetat kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda tera dan dikocok sampai larut sempurna..

Larutan HCl 1,0 M

Asam klorida pekat sebanyak 8,3 mL diencerkan ke dalam labu ukur 100 mL dengan aquades sampai tanda batas. Larutan HCl 0,1 M dibuat dengan mengencerkan dari larutan HCl 1,0 M.

Penentuan Absorbansi dan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol*

Penentuan absorbansi dan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol* menggunakan larutan *chloramphenicol* 100 ppm dan diukur absorbansi dan panjang gelombang maksimumnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada rentang 200-400 nm.

Pembuatan Senyawa azo sulfanilamid kopliling CAP

Diambil 0,3% sulfanilamid sebanyak 3,0 mL ke dalam gelas kimia 50 mL. Selanjutnya ditambahkan 3,0 mL HCl 0,1 M diaduk sampai tercampur sempurna. Selanjutnya ditambahkan 6,0 mL NaNO₂ 1% dan diaduk kembali sampai tercampur sempurna dan diaduk. ditambahkan 500 µg/mL *chloramphenicol* sebanyak 2,0 mL di aduk pada suhu dingin dan terbentuk senyawa azo. Senyawa azo yang dihasilkan diencerkan menggunakan aquades sampai tanda batas.

Pembuatan Kurva Kalibrasi

Diambil larutan 0,1 M HCl 3,0 mL dan 6 mL larutan NaNO₂ 1% dimasukkan masing-masing ke dalam gelas kimia yang sudah berisi 3,0 mL larutan sulfanilamid 0,3%. selanjutnya diaduk pada suhu dingin sampai tercampur sempurna pada suhu dingin. masing-masing gelas ditambahkan *chloramphenicol* konsentrasi 500 µg/mL sebanyak 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 dan 4,0 mL, selanjutnya diaduk selama 8 menit pada suhu dingin. Masing-masing diencerkan ke dalam labu takar 25 mL menggunakan aquades sampai tanda tera. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis.

Analisis *chloramphenicol* dalam udang dengan metode adisi standar

Analisis *chloramphenicol* dalam sampel udang dengan metode adisi dilakukan dengan menghaluskan udang yang tidak mengandung *chloramphenicol* dengan alu dan lumpang, kemudian diambil 5 gram udang, kemudian ditambahkan etanol kemudian disaring. Kemudian dipindahkan ke dalam tiga tabung sentrifugasi lalu ditambahkan larutan TCA 10% dengan perbandingan 1:1 dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 8 menit. Terbentuk 2 fase, diambil dan dipindahkan fase atas ke dalam gelas kimia. kemudian ditambahkan larutan *chloramphenicol* dengan konsentrasi 20 µg/mL, 50 µg/mL, dan 80 µg/mL. Kemudian digunakan untuk reaksi kopliling dengan sumber garam diazonium yang telah dibuat sebelumnya sesuai prosedur pada kondisi optimum percobaan. Larutan yang dihasilkan diencerkan ke dalam labu ukur 25 mL menggunakan aquades dan dikocok sampai tercampur sempurna. Larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Absorbansi dan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol*

Hasil spektra pengukuran absorbansi dan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol* pada rentang panjang gelombang sinar UV yaitu 276,183 nm. Aisha [5] melakukan penentuan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol* dimana diperoleh panjang gelombang yaitu 278 nm dimana hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan hasil penentuan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol* yang telah dilakukan.

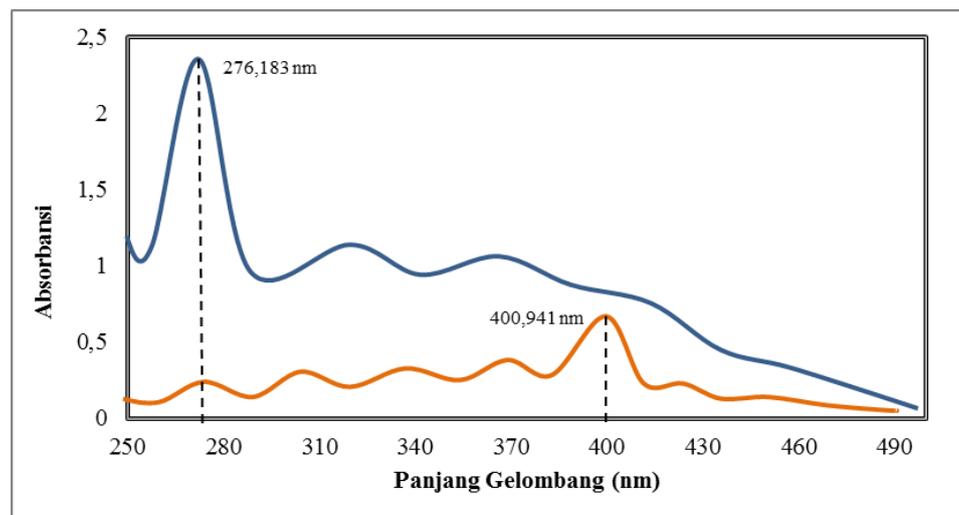
Absorbansi dan panjang gelombang maksimum pada senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol*

Hasil spektra pengukurun absorbansi dan panjang gelombang maksimum senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol* diperoleh panjang gelombang yaitu 400,941 nm.

Pada pembentukan senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol* terjadi dua tahapan reaksi. Pada tahap pertama yaitu reaksi diazotasi sulfanilamid ketika direaksikan dengan HCl dan NaNO₂, reaksi ini terjadi disebabkan karena gugus amina primer pada cincin aromatis sulfanilamid akan bereaksi dengan asam nitrat melalui ion nitrosonium.

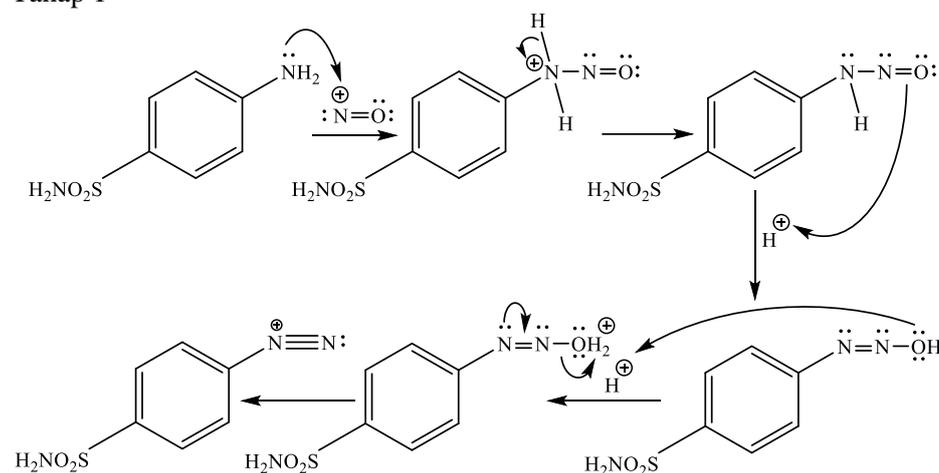
Pada tahap kedua terjadi reaksi kopliling, garam diazonium bertindak sebagai elektrofil lemah yang akan menyerang *chloramphenicol* yang bersifat nukleofilik. Dimana garam diazonium akan terikat pada posisi meta

karena disebabkan adanya efek sterik dimana gugus 2,2 -dichloro-N-(1,3-dihydroxybutan-2-yl)acetamide memiliki bobot yang lebih besar daripada gugus NO₂ sehingga senyawa azo Sulfanilamid-chloramphenicol dapat terbentuk.



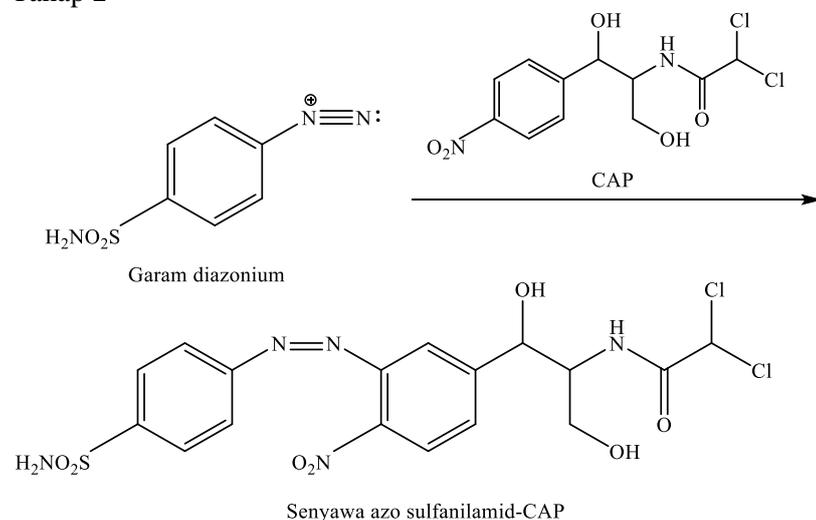
Gambar 1. Panjang gelombang maksimum chloramphenicol, dan senyawa Azo sulfanilamid-chloramphenicol

Tahap 1



Gambar 2. Reaksi pembentukan garam diazonium

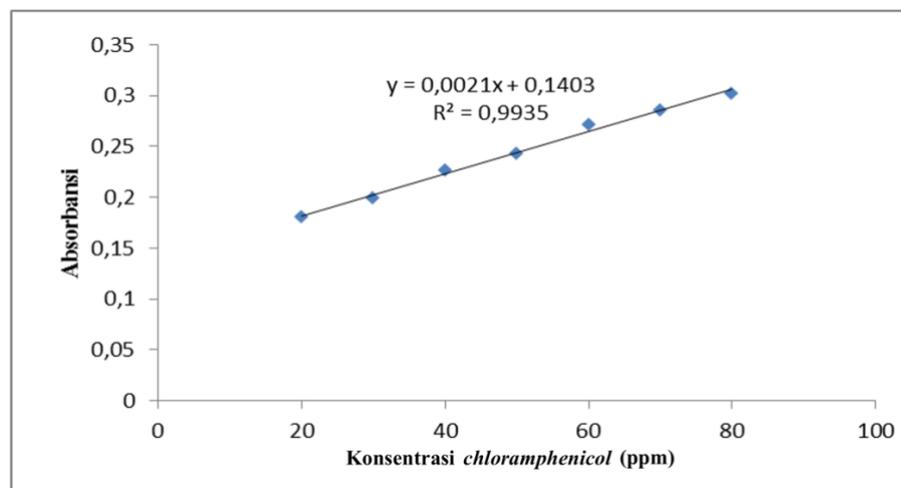
Tahap 2



Gambar 3. Reaksi kopling garam diazonium dengan chloramphenicol

Pembuatan kurva kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi menggunakan konsentrasi *chloramphenicol* yang bervariasi dengan rentang 20 sampai 80 µg/mL. didapatkan koefisien korelasi $R^2 = 0,9935$ dengan $y = 0,0021x + 0,1403$. Berdasarkan hasil perhitungan nilai R yang didapatkan semakin mendekati 1 atau sama dengan 1 maka mempunyai nilai yang baik [6].



Gambar 4. Kurva Kalibrasi *chloramphenicol*

Tabel 1. Karakteristik metode penentuan *chloramphenicol*

Parameter	Nilai
Jenis metode	Kopling azo
Reagen sumber garam diazonium	Sulfanilamid
Panjang gelombang maksimum, λ_{\max} (nm)	400,941 nm
Warna senyawa azo	Kuning jernih
Rentang Hukum Beer ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	20 – 80
Absorptivitas molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	1779,8807
Sensitivitas Sandell's ($\mu\text{g cm}^{-2} / 0,001$ unit absorbansi)	0,1966
Persamaan regresi ($y = bx + a$)	
Slop (b)	0,0021
Intersep (a)	0,1403
Koefisien korelasi (r)	0,9967

Nilai Linearitas

Penentuan linearitas ditentukan dari persamaan regresi linear kurva kalibrasi. Berdasarkan kurva tersebut diperoleh nilai serapan meningkat secara linear seiring dengan meningkatnya konsentrasi *chloramphenicol* yang diberikan. Hubungan linear yang terjadi menunjukkan bahwa nilai serapan berbanding lurus dengan kadar *chloramphenicol* pada batas Hukum Beer dalam rentang 20-80 µg/mL. Linearitas didapat dari harga koefisien regresi (R^2) yang diperoleh dari persamaan regresi linear. Berdasarkan nilai koefisien korelasi yang didapatkan ($r = 0,9967$) dan hasil uji t diperoleh $t_{\text{hit}} > t_{\text{tabel}}$. Keduanya menggambarkan terdapat korelasi linear antara konsentrasi *chloramphenicol* dengan nilai serapan. Hasil perhitungan koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0,9967, artinya 99,67% perubahan nilai serapan dipengaruhi oleh konsentrasi *chloramphenicol*.

Nilai Sensitivitas

Sensitivitas suatu metode ditentukan berdasarkan harga kemiringan (*slope*) dari persamaan regresi linier kurva kalibrasi [8]. Semakin besar nilai *slope* menunjukkan perubahan konsentrasi analit yang sedikit akan memberi perubahan serapan yang besar, sehingga sensitivitas metode dikatakan baik [9]. Berdasarkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi diperoleh nilai sensitivitas 0,0021 mL/µg. Nilai tersebut menunjukkan bahwa dengan perubahan konsentrasi *chloramphenicol* sebesar 10,0 µg/mL akan menghasilkan perubahan serapan sebesar 0,0021.

Berdasarkan nilai sensitivitas tersebut dapat dikatakan metode yang diusulkan memiliki sensitivitas yang cukup baik. Hal ini didukung dengan perolehan absorptivitas molar yang tinggi sebesar 1779,8807 L/mol cm.

Nilai Presisi

Perhitungan nilai presisi ditentukan melalui koefisien variasi (KV) yang diperoleh dari proses pengukuran yang dilakukan secara berulang. Pada penelitian ini untuk mengetahui presisi dari metode yang diusulkan sesuai hasil optimasi sebelumnya, dilakukan pengukuran pada tiga konsentrasi berbeda dengan tiga kali pengulangan. Penentuan presisi diambil dari data konsentrasi *chloramphenicol* 20 µg/mL, 40 µg/mL dan 70 µg/mL. Dari hasil perhitungan diperoleh nilai koefisien variasi pada konsentrasi *chloramphenicol* 20 µg/mL; 40 µg/mL; dan 70 µg/mL berturut-turut adalah 4,0269%, 1,9509 % dan 4,2771 %. Sedangkan koefisien variasi rata-rata perhitungan diperoleh 3,4183 %.

Limit deteksi

Limit deteksi atau *limits of detection* (LOD) menyatakan jumlah terkecil analit yang masih dapat memberikan sinyal yang dapat ditangkap oleh detektor. Sedangkan limit kuantitas atau *limits of quantitation* (LOQ) adalah konsentrasi terkecil dari suatu sampel yang dianalisis dengan penentuan kuantitatif dapat menunjukkan hasil yang teliti. Semakin kecil nilai limit deteksi suatu metode, maka semakin baik pula metode tersebut dalam mendeteksi suatu analit. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh limit deteksi dan limit kuantifikasi masing-masing adalah 6,2411 µg/mL dan 20,8036 µg/mL. Nilai tersebut merupakan batas terkecil dari konsentrasi *chloramphenicol* yang masih dapat dianalisis secara spektrofotometri berbasis reaksi diazotasi.

Akurasi Metode pada udang windu dengan Metode Adisi Standar

Data akurasi lebih lanjut dipastikan dengan melakukan percobaan *recovery* pada tiga konsentrasi *chloramphenicol* yang berbeda menggunakan metode adisi standar. Konsentrasi *chloramphenicol* yang ditambahkan masing-masing 20 µg/mL, 50 µg/mL dan 80 µg/mL. Metode adisi standar diaplikasikan pada penentuan *chloramphenicol* dalam diselidiki untuk membuktikan bahwa metode yang diusulkan tidak terpengaruh oleh matriks sampel.

Tabel 2. Tabel hasil perhitungan *recovery*

<i>Chloramphenicol</i> ditambahkan (µg/mL)	<i>Chloramphenicol</i> yang diperoleh (µg/mL)	<i>Recovery</i> (%) (n =3)
20	20,1746	100,8730
50	49,8571	99,7143
80	80,3333	100,4167
Rerata		100,3347

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian pada penentuan *chloramphenicol* dengan metode adisi standar pada konsentrasi *chloramphenicol* 20 µg/mL, 50 µg/mL dan 80 µg/mL. Pada *recovery* diperoleh masing-masing adalah 100,8730%, 99,7143% dan 100,4167%. Sedangkan *recovery* rata-ratanya adalah 100,3347%. Pada nilai koefisien variasi diperoleh berturut-turut adalah 4,0269 %, 1,9509 % dan 4,2771 %. Sedangkan koefisien variasi rata-rata perhitungan diperoleh 3,4183 %. Dengan nilai LOD dan LOQ masing-masing sebesar 6,2411 µg/mL dan 20,8036 µg/mL. Serta nilai sensitivitas sebesar 0,0021 mL/µg dengan perolehan absorptivitas molar sebesar 1779,8807 L/mol cm. Metode ini dapat digunakan pada sampel yang memiliki konsentrasi diatas 6,2411 ppm, jika diatas konsentrasi tersebut metode ini tidak dianjurkan ataupun direkomendasikan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Atmomarsono, Muliani, dan M., M. I. Madeali. 2000. *Teknologi Budidaya Udang Berkelanjutan*. Balai Penelitian Perikanan Pantai Maros. Konferensi Nasional II Pengelolaaan Sumberdaya Pesisir dan lautan Indonesia,
- [2] Lestari, Lies Amin dan Wahab, Abdul. 1999. *Menulis Karya Ilmiah*. Surabaya: Airlangga University Press

- [3] Yuningsih., Juariah, dan Murdiati, T. B., S. 2005. *Keberadaan Residu Antibiotik Tilosin (golongan makrolida) Dalam Daging Ayam Asal Daerah Sukabumi, Bogor Dan Tangerang*. Jurnal Penelitian Valentir, 2(3), 921- 925
- [4] Jannah, Miftahul. 2014. *Waktu Henti Chloramphenicol Pada Lobster (Chorax Quadricarinatus) Air Tawar*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga
- [5] Aisha, Sarah, Bambang Kuswandi dan Dwi Koko Pratoko. 2018. *Pengembangan Sensor Kloramfenikol Berbasis Bouvine Serum Albumin Menggunakan Spektrofotometri UV*. E-Jurnal Pustaka Kesehatan. Vol 6. No.1
- [6] Riyanto, 2014. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. Edisi 1. Cetakan 1*. Yogyakarta: Deepublish
- [7] Skoog, D.A., 1985, *Prinsiples of Instrumental Analysis*, CBS College Publishing, USA.
- [8] Miller, J.C. dan Miller. J.N. 1988. *Statistict for Analytical Chemistry. Second Edition*. New York: John Wiley & Son