

Pakan buatan – Bagian 13: Ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forsskal 1775)

Pengguna dari RSNI ini diminta untuk menginformasikan adanya hak paten dalam dokumen ini, bila diketahui, serta memberikan informasi pendukung lainnya (pemilik paten, bagian yang terkena paten, alamat pemberi paten dan lain-lain).

© BSN 2024

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN

Email: dokinfo@bsn.go.id www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Pendahuluan	v
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Persyaratan mutu	2
5 Metode uji	3
5.1 Cemaran <i>Salmonella</i>	3
5.2 Total aflatoksin	3
5.3 Kandungan antibiotik	3
5.4 Kandungan logam berat	3
5.5 Kadar melamin	3
5.6 Kadar air	3
5.7 Kestabilan pakan dalam air	3
5.8 Kandungan nutrisi	3
5.9 Kadar nitrogen bebas	3
Pengujian sesuai dengan Lampiran I.	3
6 Cara pengemasan dan pelabelan	3
Lampiran A (normatif) Metode uji total aflatoksin	5
Lampiran B (normatif) Metode uji nitrofurantoin dengan liquid chromatography-ionspray tandem massspectrometry	7
Lampiran C (normatif) Metode uji kloramfenikol (<i>Chloramphenicol</i> atau CAP)	10
Lampiran D (normatif) Metode uji kloramfenikol (CAP) dengan liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry	13
Lampiran E (normatif) Metode uji oksitetrasiklina (OTC)	17
Lampiran F (normatif) Metode uji kadar tetrasiklina, oksitetrasiklina dan klortetrasiklina dengan metode <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> (LC-MS/MS)	19
Lampiran G (normatif) Metode uji melamin	24
Lampiran H (normatif) Metode uji kestabilan pakan dalam air.....	26
Lampiran I (normatif) Metode uji kadar nitrogen bebas	27
Bibliografi	28
Tabel 1 - Persyaratan mutu pakan ikan bandeng.....	2
Tabel B1 - Gradient start	8
Tabel B2 - Precursor/product ions	9
Tabel D1 - Kondisi kromatografi pada pengujian CAP	15
Tabel D2 - Persentase fase gerak terhadap waktu retensi.....	15

Tabel F1 - Penambahan larutan standar kerja campuran.....	20
Tabel F2 - Komposisi gradien fase gerak	21
Tabel F3 - Kondisi akuisisi <i>multiple reaction monitoring analit</i> pada detektor MS/MS	21
Tabel F4 - Kriteria deviasi rasio ion.....	22

Prakata

SNI 9043-13:2024 Pakan buatan – Bagian 13: Ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forsskal 1775) yang dalam bahasa Inggris berjudul *Artificial feed – Part 13: Milkfish (Chanos chanos, Forsskal 1775)* merupakan revisi dari SNI 7308:2018 tentang Pakan buatan untuk ikan bandeng (*Chanos chanos* Forsskal 1775). Standar ini disusun dengan metode pengembangan sendiri dan ditetapkan oleh BSN Tahun 2024.

Revisi dalam Standar ini meliputi:

1. Perubahan judul menjadi bagian dari seri SNI pakan buatan dengan judul “Pakan buatan – Bagian 13: Ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forsskal 1775)”.
2. Penambahan acuan normatif.
3. Perubahan ruang lingkup semula mencakup “syarat mutu dan klasifikasi, metode uji, penandaan dan cara pengemasan pakan buatan untuk ikan bandeng.” menjadi “persyaratan mutu, metode uji, cara pengemasan dan pelabelan pakan buatan ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forsskal 1775)”.
4. Perubahan acuan normatif yang semula menggunakan acuan normatif standar untuk produk perikanan menjadi menggunakan acuan normatif terkait cara pengujian pakan.
5. Perubahan istilah dan definisi menjadi istilah dan definisi yang disesuaikan dengan istilah pada syarat mutu pakan.
6. Perubahan persyaratan mutu yang semula berdasarkan ukuran ikan (nener, gelondongan, konsumsi dan induk) menjadi segmentasi pemeliharaan ikan (benih, pembesaran dan induk).
7. Perubahan pada persyaratan mutu pakan ikan bandeng, perubahan parameter kandungan antibiotik pada nitrofurantoin dari sebelumnya metabolit (AOZ dan AMOZ) menjadi *parent drugs*; penambahan antibiotik oksitetrasiklina, total aflatoksin dan melamin; perubahan nilai pada logam berat, *Salmonella*, kestabilan pakan dalam air; persyaratan nilai kadar protein, lemak, serat kasar dan abu yang sebelumnya adalah persyaratan yang harus dipenuhi, menjadi persyaratan yang bersifat rekomendasi; sedangkan untuk diameter pakan, konversi pakan dan fosfor total pakan tidak lagi menjadi persyaratan mutu pakan.
8. Perubahan metode uji yang sebelumnya menggunakan metode uji untuk produk perikanan menjadi metode uji untuk pakan ikan.
9. Penambahan metode uji, kandungan antibiotik (nitrofurantoin, kloramfenikol dan oksitetrasiklina), logam berat, total aflatoksin dan melamin pada pakan.

Standar ini merupakan bagian seri SNI Pakan buatan yang terdiri dari beberapa bagian yaitu:

- SNI 9043-1 Pakan buatan – Bagian 1 : Udang windu (*Penaeus monodon*, Fabricius 1978);
- SNI 9043-2 Pakan buatan – Bagian 2 : Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931);
- SNI 9043-3 Pakan buatan – Bagian 3: Ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus*, Lacepede 1803);
- SNI 9043-4 Pakan buatan – Bagian 4: Ikan lele (*Clarias* spp.);
- SNI 9043-5 Pakan buatan – Bagian 5 : Ikan mas (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758);
- SNI 9043-6 Pakan buatan – Bagian 6 : Pembesaran ikan kerapu;
- SNI 9043-7 Pakan buatan – Bagian 7 : Larva dan pascalarva udang penaeid;
- SNI 9043-8 Pakan buatan – Bagian 8: Ikan gurami (*Osphronemus goramy* Lac.);
- SNI 9043-9 Pakan buatan – Bagian 9: Benih ikan laut;
- SNI 9043-10 Pakan buatan – Bagian 10: Pembesaran ikan laut;
- SNI 9043-11 Pakan buatan – Bagian 11: Ikan nila (*Oreochromis* spp.);
- SNI 9043-12 Pakan buatan – Bagian 12: Ikan patin (*Pangasius* spp.);
- **SNI 9043-13:2024 Pakan buatan – Bagian 13: Ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forsskal 1775).**

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus secara *hybrid* pada tanggal 25 April 2024 di Bogor, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 3 Juni 2024 sampai dengan 2 Juli 2024 dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.

Pendahuluan

Standar ini dirumuskan agar dapat dipergunakan oleh pembudidaya, pelaku usaha dan instansi lainnya yang memerlukan untuk pembinaan mutu dalam rangka pendaftaran pakan ikan.

Standar ini dirumuskan sebagai upaya meningkatkan jaminan mutu, mengingat pakan buatan untuk ikan bandeng pada kegiatan budidaya ikan bandeng, sehingga diperlukan persyaratan teknis tertentu. Untuk itu, perlu disusun revisi SNI pakan buatan untuk ikan bandeng sebagai suatu standar yang berlaku nasional.

Standar ini disusun dengan memperhatikan peraturan sebagai berikut:

1. Undang-Undang Nomor 6 Tahun 2023 tentang Penetapan Peraturan Pemerintah Pengganti Undang-Undang Nomor 2 Tahun 2022 tentang Cipta Kerja menjadi Undang-Undang.
2. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2017 tentang Pembudidayaan Ikan.
3. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 2024 tentang Pengendalian Pelaksanaan Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Kelautan dan Perikanan.
4. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 4 Tahun 2023 tentang Pakan Ikan.
5. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 10/PERMEN-KP/2021 tentang Standar Kegiatan Usaha dan Produk pada Penyelenggaraan Perizinan Berusaha Berbasis Risiko Sektor Kelautan dan Perikanan.
6. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 6/PERMEN-KP/2020 tentang Penyelenggaraan Kesejahteraan Ikan pada Ikan Budidaya.
7. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 37/PERMEN-KP/2019 tentang Pengendalian Residu pada Kegiatan Pembudidayaan Ikan Konsumsi.
8. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 1/PERMEN-KP/2019 tentang Obat Ikan.
9. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 57/ PERMEN-KP/2018 tentang Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan.
10. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 35 Tahun 2016 tentang Cara Pembenihan Ikan yang Baik.
11. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor 2 Tahun 2007 tentang Cara Budidaya Ikan Yang Baik.

Pakan buatan – Bagian 13: Ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forsskal 1775)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan persyaratan mutu, metode uji, cara pengemasan dan pelabelan pada pakan buatan ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forsskal 1775).

2 Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan Standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan tersebut (termasuk seluruh perubahan/amendemennya).

SNI ISO 6579-1 Mikrobiologi rantai pangan – Metode horizontal untuk deteksi, enumerasi dan serotyping *Salmonella* – Bagian 1: Deteksi *Salmonella* spp

SNI 9091-1 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 1: Kadar air

SNI 9091-2 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 2: Kadar abu

SNI 9091-3 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 3: Kadar lemak kasar metode Soxhlet

SNI 9091-4 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 4: Kadar protein kasar dengan metode Kjeldahl

SNI 9091-5 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 5: Kadar serat kasar

SNI ISO 16634-1 Produk pangan – Penentuan kandungan nitrogen total dengan pembakaran menurut prinsip Dumas dan perhitungan kandungan protein kasar - Bagian 1: Biji-bijian dan bahan baku pakan

AOAC 975.36. *Official Methods of Analysis of AOAC International sub chapter 2 Aflatoxins in food and feed*

AOAC 977.15. *Official Methods of Analysis of AOAC International chapter 9: Mercury in fish, Alternative Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*

AOAC 999.11. *Official Methods of Analysis of AOAC International chapter 9: Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc by Atomic Absorption Spectrophotometer*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini berlaku

3.1

pakan benih

pakan yang digunakan untuk pemeliharaan nener (ikan bandeng berukuran 10 mm sampai dengan 30 mm), sampai selesai tahap penggelondongan

3.2

pakan buatan

kombinasi beberapa bahan baku pakan yang dibuat melalui suatu proses sehingga dapat dikonsumsi oleh ikan

3.3

pakan induk

pakan yang digunakan pada kegiatan pemeliharaan induk

3.4

pakan pembesaran

pakan yang digunakan pada tahap pembesaran

4 Persyaratan mutu

Persyaratan mutu pakan ikan bandeng sesuai dengan Tabel 1.

Tabel 1 - Persyaratan mutu pakan ikan bandeng

No	Jenis	Satuan	Persyaratan mutu		
			Benih	Pembesaran	Induk
1	<i>Salmonella</i> dalam 25 g contoh ^{a)}	koloni	negatif	negatif	negatif
2	Total Aflatoksin ^{a)}	µg/kg	maksimal 20	maksimal 20	maksimal 20
3	Antibiotik:				
	- Nitrofuram (<i>parent drugs</i>) ^{a)}	µg/kg	Ttd	ttd	ttd
	- Kloramfenikol ^{a)}	µg/kg	Ttd	ttd	ttd
	- Oksitetrasiklina ^{a)}	µg/kg	ttd	ttd	ttd
4	Logam berat				
	- Timbal (Pb) ^{a)}	mg/kg	maksimal 5,0	maksimal 5,0	maksimal 5,0
	- Merkuri (Hg) ^{a)}	mg/kg	maksimal 0,5	maksimal 0,5	maksimal 0,5
	- Kadmium (Cd) ^{a)}	mg/kg	maksimal 1,0	maksimal 1,0	maksimal 1,0
5	Melamin ^{a)}	mg/kg	ttd	ttd	ttd
6	Kadar air ^{a)}	%	maksimal 12	maksimal 12	maksimal 12
7	Kestabilan pakan dalam air ^{a) b)}				
	- Pakan apung (15 menit)	%	minimal 80	minimal 80	minimal 80
	- Pakan tenggelam (5 menit)	%	minimal 80	minimal 80	minimal 80
8	Protein ^{c)}	%	minimal 35	minimal 25	minimal 40
9	Lemak ^{c)}	%	minimal 5	minimal 5	minimal 7
10	Serat kasar ^{c)}	%	maksimal 7	maksimal 10	maksimal 7
11	Abu ^{c)}	%	maksimal 12	maksimal 12	maksimal 12
12	Nitrogen Bebas ^{c)}	%	maksimal 0,2	maksimal 0,2	maksimal 0,2

^{a)} persyaratan yang harus dipenuhi^{b)} pengujian kestabilan pakan dalam air tidak dipersyaratkan pada pakan berbentuk tepung dan remah^{c)} nilai pada persyaratan ini rekomendasi namun nilai yang tercantum pada label harus sesuai dengan nilai hasil uji**CATATAN**

ttd adalah tidak terdeteksi.

Nitrofuram dinyatakan tidak terdeteksi jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai $CC\alpha$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 30 µg/kg).Kloramfenikol dinyatakan tidak terdeteksi jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai $CC\alpha$ atau nilai $CC\beta$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 3 µg/kg).Oksitetrasiklina dinyatakan tidak terdeteksi jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai $CC\alpha$ atau nilai $CC\beta$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 100 µg/kg).Melamin dinyatakan tidak terdeteksi jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai $CC\beta$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 2,5 mg/kg).

5 Metode uji

5.1 Cemaran *Salmonella*

Pengujian sesuai dengan SNI ISO 6579-1.

5.2 Total aflatoksin

Pengujian sesuai dengan Lampiran A dan/atau dikonfirmasi dengan AOAC 975.36.

5.3 Kandungan antibiotik

- a) Pengujian nitrofurantoin sesuai Lampiran B.
- b) Pengujian kloramfenikol sesuai Lampiran C dan dikonfirmasi sesuai Lampiran D.
- c) Pengujian oksitetrasiklin sesuai Lampiran E dan dikonfirmasi sesuai Lampiran F.

5.4 Kandungan logam berat

Pengujian kandungan Pb dan Cd sesuai AOAC 999.11, pengujian kandungan Hg sesuai AOAC 977.15.

5.5 Kadar melamin

Pengujian sesuai Lampiran G.

5.6 Kadar air

Pengujian kadar air sesuai SNI 9091-1.

5.7 Kestabilan pakan dalam air

Pengujian sesuai dengan Lampiran H.

5.8 Kandungan nutrisi

- a) Pengujian kadar protein sesuai SNI ISO 16634-1 atau SNI 9091-4.
- b) Pengujian kadar lemak sesuai SNI 9091-3.
- c) Pengujian kadar serat kasar sesuai SNI 9091-5.
- d) Pengujian kadar abu sesuai SNI 9091-2.

5.9 Kadar nitrogen bebas

Pengujian sesuai dengan Lampiran I.

6 Cara pengemasan dan pelabelan

Pakan ikan dikemas dalam wadah tertutup rapat yang kedap air, tidak mudah rusak, tidak beracun dan tidak mengontaminasi pakan ikan, serta menjamin stabilitas dan keamanan mutu pakan ikan selama penyimpanan dan pengangkutan.

Kemasan pakan ikan harus diberi label berbahasa Indonesia dengan mencantumkan informasi paling sedikit memuat sebagai berikut:

- a) nomor sertifikat pendaftaran pakan ikan;
- b) nama perusahaan/produsen;
- c) alamat perusahaan;
- d) merek pakan ikan;
- e) jenis pakan ikan (sifat, bentuk dan tahapan budidaya);
- f) peruntukan pakan ikan;
- g) bobot bersih (neto);
- h) kandungan bahan baku pakan ikan;
- i) persentase kandungan nutrisi (protein, air, lemak, serat kasar, abu);

RSNI 9043-13:2024

- j) cara penyimpanan;
- k) cara penggunaan;
- l) tanggal kedaluwarsa, dan
- m) kode produksi.

Lampiran A
(normatif)
Metode uji total aflatoksin

A.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan deteksi metabolit total aflatoksin dengan prinsip *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Aflatoksin bebas dalam contoh akan berikatan dengan antibodi setelah penambahan enzim konjugat. Aktivitas ikatan enzim akan terlihat secara jelas setelah penambahan sejumlah substrat kromogenik. Nilai absorbans berbanding terbalik dengan konsentrasi aflatoksin di dalam contoh.

A.2 Peralatan

- a) blender (*homogenizer*);
- b) *centrifuge*;
- c) labu *Erlenmeyer*;
- d) labu ukur;
- e) *microtiter plate reader* (450 nm);
- f) mikropipet (volume: 100 μL , 200 μL dan 1.000 μL);
- g) *multi channel* pipet;
- h) neraca analitik ketelitian 0,1 mg;
- i) tabung sentrifus polistirena 50 mL;
- j) *vortex*.

A.3 Pereaksi**A.3.1 Bahan kimia**

- a) air distilasi;
- b) metanol 70%.

A.3.2 Bahan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) kit

- a) enzim konjugat;
- b) larutan penghenti reaksi (*stop solution*);
- c) larutan standar aflatoksin sesuai dengan jenis kit yang digunakan;
- d) substrat kromogen.

A.4 Prosedur kerja**A.4.1 Ekstraksi contoh**

- a) timbang 5 g \pm 0,01 g contoh yang sudah dihaluskan lalu masukkan ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan 25 mL metanol 70% kemudian kocok selama 3 menit sampai dengan homogen;
- b) sentrifugasi dengan kecepatan 4.500 *r/min* (3.000 $\times g$, $r=10$ cm) selama 5 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- c) ambil 100 μL larutan untuk analisis *ELISA*;
- d) faktor pengenceran : 1,0.

A.4.2 Proses pengujian *ELISA*

- a) siapkan *microtiter plate* sesuai jumlah standar dan contoh yang akan uji;
- b) masukkan 200 μL konjugat ke dalam beberapa *well* sesuai jumlah standar dan contoh;
- c) masukkan 100 μL masing-masing larutan standar aflatoksin ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi;
- d) masukkan 100 μL masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula;
- e) pindahkan 100 μL larutan konjugat beserta standar dan contoh yang telah dihomogenkan sebelumnya ke dalam *microtiter plate* yang baru;
- f) inkubasikan *microtiter plate* selama 15 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;

- g) buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu;
- h) bilas *microtiter plate* dengan 250 µL air distilasi sebanyak tiga kali;
- i) tambahkan 100 µL *substrate solution* dan inkubasikan kembali selama 5 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- j) tambahkan 100 µL *stop solution* ke dalam setiap *well*;
- k) homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual;
- l) baca absorbans setiap *well* dengan *microtiter plate reader (ELISA reader)* pada panjang gelombang 450 nm dengan segera.

CATATAN Prosedur kerja disesuaikan dengan kit yang digunakan.

A.5 Perhitungan

- a) kurva kalibrasi standar aflatoksin dapat dibuat dari pembacaan % absorbans setiap standar dengan konsentrasi standar dalam µg/kg pada kurva logaritma;

$$\text{Absorbans (\%)} = \frac{\text{absorbans standar atau contoh}}{\text{absorbans standar 0 (B0)}} \times 100 \quad (1)$$

- b) masukkan hasil pembacaan % absorbans contoh ke dalam kurva kalibrasi standar;
- c) nilai konsentrasi aflatoksin pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai µg/kg setelah dikalikan faktor pengenceran 1,0.

A.6 Penulisan hasil uji

- a) hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- b) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35
15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36
15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) nilai tidak terdeteksi (ttd), jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai $CC\beta$ (< 0,5 dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 20 µg/kg).

Lampiran B
(normatif)
Metode uji nitrofurantoin dengan liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry

B.1 Prinsip

Substansi uji diekstrak dari contoh dengan etil asetat dan dihitug dengan *Ultra performance Liquid Chromatography* dalam *reverse phase* menggunakan detektor *tandem mass spectrometry* (UPLC-MS/MS). Ionisasi terjadi dalam mode *electrospray* positif dan negatif, *analyzer* adalah *triple quadrupole* dan mode akuisisi MRM.

B.2 Daftar singkatan

AcN	: <i>acetonitrile multisolvent</i>
CC α	: <i>decision limit</i>
CC β	: <i>detection capability</i>
ESI	: <i>electrospray ionization</i>
FTD	: <i>furaltadone</i>
FZD	: <i>furazolidone</i>
HM	: <i>high mass</i>
HPLC	: <i>high performance liquid chromatography</i>
IS	: <i>internal standard</i>
LM	: <i>low mass</i>
LoQ	: <i>limit of quantification</i>
MeOH	: <i>methanol HPLC grade</i>
MRM	: <i>multiple reaction monitoring</i>
NFT	: <i>nitrofurantoin</i>
NFZ	: <i>nitrofurazone</i>
UPLC	: <i>ultra performance liquid chromatography</i>

B.3 Peralatan

- a) *automatic pipettes* dan *automatic dispenser* berbagai ukuran;
- b) botol *amber glass* berbagai volume;
- c) *freezer*;
- d) gelas piala;
- e) labu takar;
- f) lemari asam;
- g) *liquid chromatography tandem* dengan *mass spectrometer*;
- h) mikro pipet ukuran 100 μ L, 1000 μ L dan 5000 μ L dengan tip;
- i) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- j) *refrigerated centrifuge*;
- k) tabung kaca ukuran 25 mL;
- l) tabung sentrifus plastik ukuran 50 mL dengan tutup;
- m) *vial* volume 2 mL;
- n) *vortex*.

B.4 Bahan kimia

- a) amonium asetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$);
- b) amonium hidroksida (NH_4OH);
- c) asetonitril (CH_3CN) HPLC grade;
- d) etil asetat ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$);
- e) IS;
- f) metanol (CH_3OH) HPLC grade;
- g) NH_2 cartridge;
- h) standar nitrofurantoin; *furaltadone* (FTD), *furazolidone* (FZD), *nitrofurantoin* (NFT), *nitrofurazone* (NFZ);

i) *ultrapure water*.

B.5 Prosedur kerja

- timbang 5 g \pm 0,01 g contoh uji dan contoh blanko (untuk kurva kalibrasi standar, kontrol contoh dan *spiked sample*) dalam tabung reaksi 50 mL;
- tambahkan larutan IS pada konsentrasi 500 μ g/kg;
- tambahkan 20 mL larutan amonium asetat 79 mmol/L (pH 4,6) kemudian naikan pH sampai dengan pH 8 dengan menambahkan larutan amonium hidroksida \geq 30%, kocok selama 15 menit sampai homogen;
- tambahkan 30 mL etil asetat, kocok selama 20 menit sampai homogen;
- sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3.000 *r/min* hingga diperoleh 3 lapisan;
- pipet semua lapisan organik (lapisan paling atas). Keringkan pada suhu 35 °C dengan mengalirkan gas nitrogen hingga tidak ada lagi etil asetat yang tersisa;
- larutkan residu dengan 2 mL larutan campuran aseton dan metanol dengan perbandingan 80 : 20.

B.6 Pemurnian

- NH₂ *cartridge* di *conditioning* dengan 5 mL larutan campuran aseton dan metanol dengan perbandingan 80 : 20, masukkan suspensi contoh ke dalam *cartridge*;
- larutkan nitrofuran dengan memasukkan 5 mL larutan campuran aseton dan metanol dengan perbandingan 80 : 20 ke dalam *cartridge* (larutan yang dihasilkan ditampung dalam botol contoh);
- keringkan larutan dengan menggunakan vakum konsentrator;
- larutkan residu dengan 500 μ L larutan campuran amonium asetat (pH 4,6) dan asetonitril dengan perbandingan 70 : 30, saring dengan filter 0,45 μ m dan masukkan ke dalam *vial*.

B.7 Chromatographic conditions

Detektor	: <i>mass spectrometer</i> MRM mode
<i>Ionization mode</i>	: <i>Electrospray</i> positif untuk FTD, FZD dan NXZ (IS) serta <i>electrospray</i> negatif untuk NFT, NFZ dan NXZ (IS)
volume injeksi	: 50 μ L
<i>column temperature</i>	: 30 °C
<i>electrospray capillary voltage</i>	: 5,0 kV
fase gerak	: A. 250 mMol amonium asetat (pH 4,6) B. asetonitril
<i>flow rate</i>	: 0,4 mL/min
gas	: nitrogen
<i>collision gas dan nebulizer gas flow</i>	: 7,4 L/min dan 9 L/min
<i>dwell time</i>	: 600 ms dan 200 ms

Tabel B.1 - Gradient start

Waktu	A (%)	B (%)
Awal	90	10
9 menit	10	90
9 menit 12 detik	90	10
13 menit	90	10
CATATAN A adalah 250 mMol amonium asetat (pH 4,6) B adalah asetonitril		

Tabel B.2 - Precursor/product ions

	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
<i>Positive mode</i>		
FTD	325,00	251,92; 280,99
FZD	226,20	121,99; 139,16
NXZ IS	276,28	120,98
<i>Negative mode</i>		
NFT	236,97	123,60; 151,97
NFZ	196,94	123,78; 149,65
NXZ IS	274,04	153,86

CATATAN Kondisi kromatografi disesuaikan dengan alat LC-MS yang digunakan.

B.8 Perhitungan

$$[Cs] = \frac{[Cv] \times V \times Ve}{A \times W} \quad (2)$$

Keterangan:

- [Cs] adalah konsentrasi nitrofurantoin contoh ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
 [Cv] adalah konsentrasi nitrofurantoin dalam vial ($\mu\text{g}/\text{L}$)
 V adalah volume akhir (50 mL), dengan faktor pengenceran 1
 V_e adalah volume ekstraksi (500 μL)
 A adalah alikuot (mL)
 W adalah bobot contoh (5 g)

B.9 Penulisan hasil uji

- hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35
 15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36
 15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- hasil tidak terdeteksi (ttd), jika hasil uji yang diperoleh dibawah nilai $CC\alpha$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Lampiran C
(normatif)
Metode uji kloramfenikol (*Chloramphenicol* atau CAP)

C.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan deteksi metabolit kloramfenikol (CAP) dengan prinsip *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). CAP yang terdapat dalam contoh akan berikatan setelah penambahan enzim konjugat. Aktivitas ikatan enzim akan terlihat secara jelas setelah penambahan sejumlah substrat kromogenik. Nilai absorbans berbanding terbalik dengan konsentrasi CAP di dalam contoh.

C.2 Peralatan

- a) blender (*homogenizer*);
- b) *centrifuge*;
- c) inkubator;
- d) labu *Erlenmeyer*;
- e) labu ukur;
- f) mikropipet (volume: 100 μ L, 200 μ L, 1.000 μ L dan 5.000 μ L);
- g) mikrotiter *plate reader* (450 nm);
- h) *multi channel* pipet;
- i) neraca analitik *ketelitian* 0,1 mg;
- j) nitrogen *evaporator*;
- k) tabung reaksi (*glass test tube*) 15 mL;
- l) tabung sentrifus polistirena 50 mL;
- m) *vortex*;
- n) *waterbath*.

C.3 Pereaksi

C.3.1 Bahan kimia

- a) air distilasi;
- b) etil asetat *grade reagent (G.R)*;
- c) n-heksana;
- d) nitrogen *high purity (H.P.)*;
- e) standar CAP.

C.3.2 Bahan ELISA kit

- a) *anti-chloramphenicol antibody*;
- b) CAP *spiking solution*;
- c) *developing solution*;
- d) *dilution buffer*;
- e) enzim konjugat;
- f) larutan penghenti reaksi (*stop solution*);
- g) larutan standar CAP sesuai dengan kit yang digunakan;
- h) *microtiter plate*;
- i) pengencer enzim konjugat;
- j) *washing buffer*.

C.4 Prosedur kerja

C.4.1 Ekstraksi contoh

- a) timbang 4 g \pm 0,01 g contoh yang sudah dihaluskan lalu masukkan ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan 6 mL etil asetat kemudian kocok selama 10 menit sampai homogen;

- b) sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 *r/min* (2.000 ×*g*, *r*=10 cm) selama 10 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- c) pindahkan 3 mL etil asetat (lapisan atas) ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian dievaporasi dengan menggunakan nitrogen *evaporator* pada suhu 50 °C;
- d) larutkan endapan (hasil evaporasi) yang telah mengering dengan 1 mL n-heksana kemudian kocok selama 30 detik sampai homogen dan tambahkan 0,5 mL 1x *dilution buffer* kemudian dikocok kembali selama 1 menit;
- e) biarkan tabung dalam *water bath* pada suhu 80 °C selama 5 menit jika masih ada emulsi di bagian permukaan;
- f) sentrifugasi dengan kecepatan 4.500 *r/min* (3.000 ×*g*, *r*=10 cm) selama 10 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- g) ambil 50 µL larutan pada lapisan bawah untuk analisis *ELISA*;
- h) faktor pengenceran: 0,25.

C.5 Proses pengujian *ELISA*

- a) masukkan 50 µL masing-masing larutan standar CAP ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi;
- b) masukkan 50 µL masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula;
- c) tambahkan 50 µL enzim konjugat ke dalam setiap *well* pada poin a dan poin b;
- d) tambahkan 100 µL antibodi ke dalam setiap *well*;
- e) inkubasikan *microtiter plate* selama 30 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- f) buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu;
- g) bilas *microtiter plate* dengan 250 µL *washing buffer* sebanyak empat kali;
- h) tambahkan 200 µL *developing solution* dan inkubasikan kembali selama 15 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- i) tambahkan 50 µL *stop solution* ke dalam setiap *well*;
- j) homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual;
- k) baca absorbans setiap *well* dengan *microtiter plate reader (ELISA reader)* pada panjang gelombang 450 nm dengan segera.

CATATAN Prosedur kerja disesuaikan dengan kit yang digunakan.

C.6 Perhitungan

- a) kurva kalibrasi standar CAP dapat dibuat dari pembacaan % absorbans setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/mL pada kurva logaritma;

$$\text{Absorbans (\%)} = \frac{\text{absorbans standar atau contoh}}{\text{absorbans standar 0 (B0)}} \times 100 \quad (3)$$

- b) masukkan hasil pembacaan % absorbans contoh ke dalam kurva kalibrasi standar;
- c) nilai konsentrasi CAP pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai µg/kg setelah dikalikan faktor pengenceran 0,25.

C.7 Penulisan hasil uji

- a) hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- b) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35
15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

RSNI 9043-13:2024

15,365 dibulatkan menjadi 15,36

15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) hasil tidak terdeteksi (ttt), jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai $CC\beta$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar $3 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Lampiran D
(normatif)
Metode uji kloramfenikol (CAP) dengan liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry

D.1 Prinsip

Substansi uji diekstrak dari contoh dengan etil asetat dan dihitung dengan *ultra performance liquid chromatography* dalam *reverse phase* menggunakan detektor *tandem mass spectrometry* (UPLC-MS/MS). Ionisasi terjadi dalam mode *electrospray negative*, analyzer adalah *triple quadrupole* dan mode akuisisi *multiple reaction monitoring* (MRM).

D.2 Daftar singkatan

AcN	: <i>acetonitrile multisolvent</i>
BEH	: <i>ethylene bridged hybrid</i>
CAP	: <i>chloramphenicol</i>
CC α	: <i>decision limit</i>
CC β	: <i>detection capability</i>
d5-CAP	: <i>DL-threo-2,2-Dichloro-N-[\beta-hydroxy-α-(hydroxymethyl)-β-(4-nitrophenyl-2,3,5,6-d4)ethyl-β-d]acetamide (C₁₁D₅H₇Cl₂N₂O₅)</i>
ESI	: <i>electrospray ionization</i>
HM	: <i>high mass</i>
HPLC	: <i>high performance liquid chromatography</i>
IS	: <i>internal standard</i>
LM	: <i>low mass</i>
LoQ	: <i>limit of quantification</i>
MeOH	: <i>methanol HPLC grade</i>
MRM	: <i>multiple reaction monitoring</i>
MRPL	: <i>minimum required performance limit</i>
ST	: <i>standard</i>
UPLC	: <i>ultra performance liquid chromatography</i>

D.3 Peralatan

- a) *acquity UPLC BEH C8 1,7 μ m 2,1 mm x 50 mm column dengan acquity UPLC BEH C8 1,7 μ m 2,1 mm x 5 mm vanguard precolumn;*
- b) *automatic pipettes dan automatic dispenser berbagai ukuran;*
- c) *botol amber glass berbagai volume;*
- d) *freezer;*
- e) *gelas piala;*
- f) *labu takar;*
- g) *lemari asam;*
- h) *liquid chromatography, tandem dengan mass spectrometer;*
- i) *mikropipet ukuran 100 μ L, 1.000 μ L, dan 5.000 μ L dengan tip;*
- j) *neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;*
- k) *refrigerated centrifuge;*
- l) *tabung kaca ukuran 25 mL;*
- m) *tabung sentrifus plastik ukuran 50 mL dengan tutup;*
- n) *vial volume 2 mL;*
- o) *vortex.*

D.4 Bahan kimia

- a) asetonitril (CH_3CN) HPLC *grade*;
- b) d5-CAP;
- c) etil asetat ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$);
- d) heksana ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$);
- e) metanol (CH_3OH) HPLC *grade*;
- f) standar CAP;
- g) *ultrapure water*.

D.5 Penyiapan larutan baku pembanding CAP

- a) Larutan stok standar
Menyiapkan stok larutan standar CAP 100 mg/L dan d5-CAP sebagai internal standar 100 mg/L, dengan menimbang standar sebanyak $0,01 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$. Tambahkan sedikit metanol untuk melarutkan dan masukkan dalam labu takar dan bilas gelas piala dengan metanol, tera labu takar sampai 100 mL.
- b) Larutan kerja standar
Dari stok larutan standar, disiapkan larutan kerja standar CAP 1 mg/L dan d5-CAP sebagai internal standar 1 mg/L dengan cara memipet 100 μL stok larutan standar dan diencerkan dengan metanol sampai volume 100 mL.
- c) Larutan kontrol standar
Dari larutan kerja, disiapkan kontrol standar CAP 100 $\mu\text{g/L}$ dan d5-CAP sebagai internal standar 100 $\mu\text{g/L}$, yaitu dengan mengambil 1 mL larutan kerja standar dan diencerkan dengan metanol sampai volume 10 mL.

D.6 Prosedur kerja

- a) timbang $5 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ contoh uji dan contoh blanko (untuk kurva kalibrasi standar, kontrol contoh dan *spiked sample*) dalam tabung reaksi 50 mL;
 - b) tambahkan 300 μL larutan IS;
 - c) tambahkan sejumlah larutan baku standar pada contoh blanko (kurva kalibrasi) dengan konsentrasi 0,00 $\mu\text{g/kg}$; 0,15 $\mu\text{g/kg}$; 0,30 $\mu\text{g/kg}$; 0,45 $\mu\text{g/kg}$; 0,80 $\mu\text{g/kg}$; 1,00 $\mu\text{g/kg}$ dan 2,00 $\mu\text{g/kg}$, *spiked sample* pada $\text{CC}\alpha$, *spiked sample* pada $\text{CC}\beta$ dan *spiked sample* pada konsentrasi MRPL;
 - d) diamkan selama 15 menit agar *solvent* larutan standar menguap;
 - e) tambahkan 10 mL etil asetat, kocok selama 2 menit sampai homogen;
 - f) sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4.000 *r/min* hingga diperoleh 3 lapisan;
 - g) pipet semua lapisan organik (lapisan paling atas). Keringkan pada suhu 40 °C dengan mengalirkan gas nitrogen hingga tidak ada lagi etil asetat yang tersisa;
 - h) suspensikan residu dengan 1 mL heksana dan tambahkan 5 mL AcN 70% kocok selama 2 menit;
 - i) sentrifugasi pada kecepatan 4.000 *r/min* selama 2 menit, ulangi jika belum terjadi pemisahan sempurna, buang lapisan heksana dan ambil supernatannya (lapisan bagian bawah);
 - j) masukkan supernatan ke *vial* injeksi;
 - k) injeksikan ke dalam kromatograf dengan urutan analisis sebagai berikut:
 - ST-0;
 - *spiked* contoh pada konsentrasi $\text{CC}\alpha$;
 - *spiked* contoh pada konsentrasi $\text{CC}\beta$;
 - ST-0;
 - contoh;
 - *spiked* contoh pada konsentrasi $\text{CC}\beta$ diinjeksi ulang.
- jika sampel memiliki konsentrasi lebih tinggi $\text{CC}\beta$, urutan analisis sebagai berikut:
- ST-0;
 - ST-1;
 - ST-2;
 - ST-3;
 - ST-4;
 - ST-0;
 - kontrol contoh pada konsentrasi MRPL;

- contoh;
- ST-3 diinjeksi ulang.

D.7 Chromatographic conditions

- a) Detektor: *mass spectrometer*
 - *MRM mode*
 - *ionization mode: Electrospray*
 - *source temperature: 120 °C*
 - *dessolvation temperature: 450 °C*
 - *dessolvation gas flow: 500 L/h*
 - *cone gas flow: 150 L/h*
- b) *Analyzer:*
 - *LM resolution 2 : 3*
 - *HM resolution 2 : 15*
 - *ion energy 2 : 2,0*
 - *collision gas flow (mL/min): 3 × e^{-0,03} sampai dengan 3,5 × e^{-0,03}*

Kondisi kromatografi pada pengujian CAP diatur sesuai dengan Tabel D1.

Tabel D1 - Kondisi kromatografi pada pengujian CAP

Analyte	Ionization mode	Parent (m/Z)	Daughter (m/Z)	Dwell (s)	Cone (v)	Collision (v)
CAP	ESI -	320,97	152,09 ^{a)} 257,09 ^{b)}	0,1	50	16 11
CAP-d5	ESI -	326,14	157,15	0,1	50	15
Keterangan :						
^{a)} <i>Quantification transition</i>						
^{b)} <i>Confirmation transition</i>						

- c) kolom : UPLC *Acquity* BEH C8 1,7 µm, 2,1 mm × 50 mm, dengan *pre-column*
- d) *flow rate* : 0,3 mL/min
- e) volume injeksi : 5 µL
- f) fase gerak : Persentase fase gerak terhadap waktu retensi sesuai dengan Tabel D2.

Tabel D2 - Persentase fase gerak terhadap waktu retensi

Waktu	Air (%)	Asetonitril (%)
Awal	90	10
2 menit 30 detik	20	80
2 menit 33 detik	90	10
5 menit	90	10

- g) stabilisasi alat dapat dicapai dengan cara mengalirkan fase gerak melewati kolomsetidaknya selama 30 menit.

CATATAN Kondisi kromatografi disesuaikan dengan alat LC-MS yang digunakan.

D.8 Perhitungan

$$[Cs] = \frac{[Cv] \times Fs \times Ve}{A \times W} \tag{4}$$

Keterangan:

- [Cs] adalah konsentrasi contoh (µg/Kg)
- [Cv] adalah konsentrasi dalam *vial* (µg/L)
- FS adalah volume akhir (mL), dengan faktor pengenceran 1
- Ve adalah volume ekstraksi (10 mL)
- A adalah alikuot (5 mL)
- W adalah bobot contoh (g)

D.9 Penulisan hasil uji

- a) hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- b) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35

15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36

15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) hasil tidak terdeteksi (tt), jika hasil uji yang diperoleh dibawah nilai $CC\alpha$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar $3 \mu\text{g}/\text{kg}$).

**Lampiran E
(normatif)
Metode uji oksitetrasiklina (OTC)**

E.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan deteksi metabolit oksitetrasiklina (OTC) dengan prinsip *enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*. OTC yang terdapat dalam contoh akan berikatan dengan antibodi setelah penambahan enzim konjugat. Aktivitas ikatan enzim akan terlihat secara jelas setelah penambahan sejumlah substrat kromogenik. Nilai absorbans berbanding terbalik dengan konsentrasi OTC di dalam contoh.

E.2 Peralatan

- m
- a) blender (*homogenizer*);
- b) *centrifuge*;
- c) labu *Erlenmeyer*;
- d) labu ukur;
- e) mikropipet (volume: 100 μL , 200 μL , 1.000 μL dan 10 mL);
- f) mikrotiter *plate reader* (450 nm);
- g) *multi channel* pipet;
- h) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- i) tabung sentrifus polistirena 50 mL;
- j) *vortex*.

E.2 Pereaksi**E.2.1 Bahan kimia**

- a) air distilasi;
- b) standar OTC.

E.2.2 Bahan ELISA kit

- a) enzim konjugat;
- b) larutan antibodi;
- c) larutan penghenti reaksi (*stop solution*);
- d) larutan standar sesuai dengan kit yang digunakan;
- e) *microtiter plate*;
- f) *sample diluent*;
- g) *standard diluent*;
- h) *substrate solution*;
- i) *washing solution*.

E.3 Prosedur kerja**E.3.1 Ekstraksi contoh**

- a) timbang 0,5 g \pm 0,01 g contoh yang sudah dihaluskan lalu masukkan ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan 29,5 mL air distilasi, kemudian kocok selama 1 menit sampai homogen;
- b) sentrifugasi dengan kecepatan 3.500 *r/min* (1.700 $\times g$, $r=10$ cm) selama 10 menit pada suhu 20 $^{\circ}\text{C}$ sampai dengan suhu 25 $^{\circ}\text{C}$;
- c) pindahkan 950 μL larutan di bagian lapisan atas ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian tambahkan 50 μL *sample diluent* 20 \times dan dikocok selama 1 menit sampai homogen;
- d) ambil 50 μL larutan pada lapisan bawah untuk analisis *ELISA*;
- e) faktor pengenceran: 60.

E.3.2 Proses pengujian ELISA

- a) siapkan *microtiter plate* sesuai jumlah standar dan contoh yang akan diuji;
- b) tambahkan 50 μL larutan standar dan contoh yang akan diuji ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi;
- c) masukkan 50 μL enzim konjugat kemudian tambahkan 50 μL larutan antibodi;
- d) inkubasikan *microtiter plate* selama 30 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- e) buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu;
- f) bilas *microtiter plate* dengan 250 μL *washing buffer* sebanyak tiga kali;
- g) tambahkan 100 μL substrat dan inkubasikan kembali selama 20 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- h) tambahkan 100 μL *stop solution* ke dalam setiap *well*;
- i) homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual;
- j) baca absorbans setiap *well* dengan *microtiter plate reader* (*ELISA reader*) pada panjang gelombang 450 nm dengan segera.

CATATAN Prosedur kerja disesuaikan dengan kit yang digunakan.

E.4 Perhitungan

- a) kurva kalibrasi standar OTC dapat dibuat dari pembacaan % absorbans setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/mL pada kurva logaritma;

$$\text{Absorbans (\%)} = \frac{\text{absorbans standar atau contoh}}{\text{absorbans standar 0 (B0)}} \times 100 \quad (5)$$

- b) masukkan hasil pembacaan % absorbans contoh ke dalam kurva kalibrasi standar;
- c) nilai konsentrasi OTC pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam $\mu\text{g}/\text{kg}$ setelah dikalikan faktor pengenceran 60,0.

E.5 Penulisan hasil uji

- a) hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- b) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35

15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36

15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) hasil tidak terdeteksi (tt), jika hasil uji yang diperoleh dibawah nilai $\text{CC}\beta$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Lampiran F (normatif)

Metode uji kadar tetrasiklina, oksitetrasiklina dan klortetrasiklina dengan metode *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS)

F.1 Prinsip

Pengukuran ini menggunakan teknik kalibrasi berbasis matrik. Contoh uji diekstrak dengan pelarut, kemudian dilakukan filtrasi dan dilanjutkan dengan menginjeksikan ke *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) untuk mendapatkan kadar analit dalam contoh uji.

F.2 Peralatan

- a) blender;
- b) *freezer* $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- c) lemari asam;
- d) mikropipet berbagai ukuran $10\text{ }\mu\text{L}$ sampai dengan $10.000\text{ }\mu\text{L}$;
- e) *mini mixer shaker*;
- f) neraca analitik dengan ketelitian $0,1\text{ mg}$;
- g) peralatan gelas (labu ukur dan gelas piala);
- h) *refrigerated centrifuge* 4.000 xg (6.000 r/min);
- i) neraca analitik dengan ketelitian $0,1\text{ mg}$;
- j) unit LC-MS/MS.

F.3 Bahan

- a) *acetonitrile liquid chromatography-grade* (LC-grade);
- b) air ultra murni;
- c) asam formiat (kemurnian 98% sampai dengan kemurnian 100%);
- d) *disodium ethylene diamine tetraacetic acid* (Na_2EDTA);
- e) metanol LC-grade;
- f) penyaring *polyvinylidene fluoride* (PVDF) $0,2\text{ }\mu\text{m}$;
- g) standar internal;
- h) standar klortetrasiklina;
- i) standar oksitetrasiklina;
- j) standar tetrasiklina;
- k) *syringe* 1 mL ;
- l) tabung sentrifus bertutup kapasitas 50 mL ;
- m) *vial*.

F.4 Prosedur

F.4.1 Ekstraksi

F.4.1.1 Ekstraksi contoh

- a) timbang $3\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ homogenat contoh blanko ke dalam tabung sentrifus 50 mL dan tutup dinding tabung dengan *aluminium foil* untuk menghindari paparan cahaya;
- b) tambahkan dengan $50\text{ }\mu\text{L}$ larutan standar kerja demeklosiklina menggunakan mikropipet;
- c) tambahkan dengan larutan standar kerja campuran tetrasiklina, oksitetrasiklina dan klortetrasiklina dan diamkan selama 30 menit;
- d) tambahkan Na_2EDTA $0,1\text{ M}$ dan asetonitril sesuai dengan Tabel F1;

Tabel F1 - Penambahan larutan standar kerja campuran

Kode standar	Standar kerja campuran yang ditambahkan (μL)	Na_2EDTA 0,1 M (μL)	Asetonitril (μL)	Konsentrasi dalam contoh ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Konsentrasi dalam <i>vial</i> ($\mu\text{g}/\text{L}$)
0	0	200	750	0	0
1	25	200	725	41,67	12,50
2	50	200	700	83,33	25,00
3	100	200	650	166,67	50,00
4	200	200	550	333,3	100,00

- e) homogenkan campuran dengan dikocok selama 30 detik dilanjutkan dengan *mini mixer* selama 5 menit;
- f) sentrifugasi campuran selama 10 menit dengan kecepatan minimal 6.000 *r/min*, dengan suhu maksimal 4 °C;
- g) ambil supernatan, pastikan lapisan minyak tidak terambil;
- h) saring melalui penyaring PVDF 0,2 μm ke dalam *vial*.

F.4.1.2 Ekstraksi kontrol positif

- a) timbang 3 g \pm 0,01 g contoh blanko ke dalam tabung sentrifus 50 mL dan tutup dinding tabung dengan *aluminium foil* untuk menghindari paparan cahaya;
- b) tambahkan dengan 50 μL larutan standar kerja demeklosiklina menggunakan mikropipet;
- c) tambahkan dengan 50 μL larutan standar kerja campuran tetrasiklina, oksitetrasiklina dan klortetrasiklina;
- d) tambahkan 200 μL larutan Na_2EDTA 0,1 M menggunakan mikropipet;
- e) tambahkan 9.700 μL asetonitril menggunakan mikropipet 10.000 μL ;
- f) homogenkan campuran dengan dikocok selama 30 detik dilanjutkan dengan *mini mixer* selama 5 menit;
- g) sentrifugasi campuran selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 *r/min*;
- h) ambil supernatan, pastikan lapisan minyak tidak terambil;
- i) saring melalui penyaring PVDF 0,2 μm ke dalam *vial*.

F.4.1.3 Ekstraksi contoh uji

- a) timbang 3 g \pm 0,01 g homogenat contoh uji ke dalam tabung sentrifus 50 mL dan tutup dinding tabung dengan *aluminium foil* untuk menghindari paparan cahaya;
- b) tambahkan dengan 50 μL larutan standar kerja demeklosiklina menggunakan mikropipet;
- c) tambahkan dengan larutan standar kerja campuran tetrasiklina, oksitetrasiklina dan klortetrasiklina;
- d) tambahkan 200 μL larutan Na_2EDTA 0,1 M menggunakan mikropipet;
- e) tambahkan 9.750 μL asetonitril menggunakan mikropipet 10 mL;
- f) homogenkan campuran dengan dikocok selama 30 detik dilanjutkan dengan *mini mixer* selama 5 menit;
- g) sentrifugasi campuran selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 *r/min*;
- h) ambil supernatan, pastikan lapisan minyak tidak terambil;
- i) saring melalui penyaring PVDF 0,2 μm ke dalam *vial*.

F.4.2 Kondisi operasi LC-MS/MS

Kondisi operasi LC-MS/MS di bawah ini:

- a) kondisi *liquid chromatography* (LC)
 1. kolom : C18 untuk kondisi yang polar 1,8 μm ; 2,1 mm x 100 mm
 2. laju air : 0,53 mL/min
 3. volume injeksi : 2 μL
 4. suhu kolom : 40 °C
 5. suhu contoh : 15 °C
 6. fase gerak : larutan asam formiat 0,1 %
asetonitril
Komposisi gradien sesuai Tabel F2

Tabel F2 - Komposisi gradien fase gerak

Waktu	Fase gerak A (%)	Fase gerak B (%)
Awal	90	10
1 menit 3 detik	90	10
1 menit 11 detik	90	10
3 menit 16 detik	50	50
4 menit	10	90
4 menit 1 detik	90	10
6 menit	90	10
CATATAN A adalah larutan asam formiat 0,1% B adalah asetonitril		

b) kondisi tandem *mass spectrometry* (MS/MS)

1. *mode ionisasi* : *electrospray ionization* (ESI), positif
2. *source temperature* : 120 °C
3. *desolvation temperature* : 500 °C
4. *cone gas flow* : 50 L/h
5. *desolvation gas flow-rate* : 1.000 L/h

F.4.3 Tahapan injeksi

Tahapan injeksi pada sistem LC-MS/MS sebagai berikut:

1. standar 2;
2. standar 2;
3. standar 2;
4. standar 0;
5. standar 1;
6. standar 2;
7. standar 3;
8. standar 4;
9. standar 0;
10. kontrol positif;
11. contoh 1;
12. contoh 2;
13. dan seterusnya maksimal 20 contoh;
14. reinjeksi standar 2;
15. larutan standar 2 tanpa contoh.

F.5 Perhitungan

Sebelum melakukan konfirmasi dan kuantifikasi, terlebih dahulu dikumpulkan data waktu retensi dan area kromatogram masing-masing ion dari senyawa analit sesuai Tabel F3. Selanjutnya dihitung waktu retensi relatif, deviasi waktu retensi relatif (%), rasio ion, deviasi rasio ion (%) dan respons faktor dari masing-masing analit.

Tabel F3 - Kondisi akuisisi *multiple reaction monitoring* analit pada detektor MS/MS

Analit	Ion Prekursor	Ion Produk	Capillary (kV)	Cone (V)	Collision (V)
Tetrasiklina	445	410 ^{a)} 154 ^{b)}	3,5	28	19 30
Oksitetrasiklina	461	426 ^{a)} 443 ^{b)}	3,5	28	18 13
Klortetrasiklina	479	444 ^{a)} 462 ^{b)}	3,5	28	20 17
Demeklosiklina	465	448 ^{a)} 154 ^{b)}	3,0	30	20 30
^{a)} Ion produk dengan intensitas tinggi (kuantifikasi) ^{b)} Ion produk dengan intensitas rendah (identifikasi)					

CATATAN Optimasi untuk masing-masing LC-MS/MS diperlukan untuk mendapatkan kromatogram optimal dari masing-masing analit.

$$\text{Ion Rasio (R)} = \frac{\text{A Ion rendah}}{\text{A Ion tinggi}} \tag{6}$$

Keterangan:

A ion rendah adalah area dari ion pecahan/produk dengan intensitas rendah dari satu analit
 A ion tinggi adalah area dari ion pecahan/produk dengan intensitas tinggi dari satu analit

$$\text{Deviasi Ion Rasio } (\Delta R) \% = \frac{\text{AR standar} - \text{R contoh}}{\text{R standar}} \times 100 \tag{7}$$

Keterangan:

R contoh adalah rasio ion dari analit dalam contoh
 R standar adalah rasio ion dari analit dalam standar

$$\text{Relatif } f \text{ } tR \text{ (RtR)} = \frac{\text{AtR analit}}{\text{tR internal standar}} \tag{8}$$

Keterangan:

tR analit adalah waktu retensi satu analit
 tR internal standar adalah waktu retensi internal standar

$$\text{Deviasi Relatif } tR (\Delta RtR) = \frac{\text{RtR contoh} - \text{RtR standar}}{\text{RtR standar}} \times 100 \tag{9}$$

Keterangan:

R_{tR} contoh adalah waktu retensi relatif dari analit dalam contoh
 R_{tR} standar adalah waktu retensi relatif dari analit dalam standar

$$\text{Respon Faktor (RF)} = \frac{\text{area ion analit}}{\text{area ion internal standar}} \tag{10}$$

Keterangan:

area ion analit adalah area produk ion dengan intensitas tinggi dari satu analit
 area ion internal standar adalah area ion internal dengan intensitas tertinggi atau bebas interferensi

$$\text{Rasio } S/N = \frac{\text{Tinggi puncak kromatogram analit}}{\text{tinggi puncak noise}} \tag{11}$$

Keterangan:

S/N adalah *signal to noise*.

F.6 Identifikasi

- a) deviasi waktu retensi relatif maksimal 2,5%;
- b) semua produk ion dari masing-masing analit harus mempunyai rasio *signal to noise* ≥ 3.

F.7 Konfirmasi

- a) semua produk ion dari masing-masing analit yang ditentukan (lihat Tabel F4) harus ada;
- b) deviasi rasio ion antara contoh dengan standar harus memenuhi kriteria yang ditetapkan yaitu sebagai berikut pada Tabel F.4.

Tabel F4 - Kriteria deviasi rasio ion

Intensitas relatif (% <i>base peak</i>)	Deviasi rasio ion
>50%	100% ± 20%
>20% to 50%	100% ± 25%
>10% to 20%	100% ± 30%
≤10%	100% ± 50%

F.8 Kuantifikasi

Jumlah kandungan masing-masing analit ditentukan dengan persamaan kurva standar dari respons faktor terhadap konsentrasi dengan menggunakan persamaan:

$$RF = aX + b \quad (12)$$

$$X = \frac{RF-b}{a} \quad (13)$$

Keterangan :

- X adalah konsentrasi analit dalam *vial* ($\mu\text{g/L}$)
- RF adalah respons faktor
- b adalah intersep dari persamaan *linier spiked*
- a adalah *slope* dari persamaan *linier spiked*

Jumlah kandungan analit dalam contoh dihitung dengan persamaan:

$$C = \frac{X \times V}{M} \quad (14)$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi analit dalam contoh ($\mu\text{g/kg}$)
- X adalah konsentrasi analit dalam *vial* ($\mu\text{g/L}$)
- V adalah volume akhir contoh (mL)
- M adalah massa contoh (g)

F.9 Penulisan hasil uji

- a) hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- b) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35
15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36
15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) hasil tidak terdeteksi (tt), jika hasil uji yang diperoleh dibawah nilai $CC\alpha$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar $100 \mu\text{g/kg}$).

Lampiran G
(normatif)
Metode uji melamin

G.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan deteksi metabolit melamin dengan prinsip *enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*. Melamin yang terdapat dalam contoh akan berikatan dengan antibodi setelah penambahan enzim konjugat. Aktivitas ikatan enzim akan terlihat secara jelas setelah penambahan sejumlah substrat kromogenik. Nilai absorbans berbanding terbalik dengan konsentrasi melamin di dalam contoh.

G.2 Peralatan

- a) blender (*homogenizer*);
- b) *centrifuge*;
- c) labu *Erlenmeyer*;
- d) labu ukur;
- e) *microtiter plate reader* (450 nm);
- f) mikropipet (volume : 100 μ L, 200 μ L, dan 1.000 μ L);
- g) *multi channel* pipet;
- h) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- i) tabung sentrifus polistirena 50 mL;
- j) *vortex*.

G.3 Pereaksi

G.3.1 Bahan Kimia

- a) air distilasi;
- b) metanol (CH_3OH).

G.3.2 Bahan ELISA kit

- a) *20x wash solution*;
- b) *2x concentrated extraction solution*.
- c) enzim konjugat;
- d) larutan antibodi;
- e) larutan penghenti reaksi (*stop solution*);
- f) larutan standar sesuai dengan kit yang digunakan;
- g) *microtiter plate*;
- h) *spiking standard*;
- i) *substrate solution (solution A dan solution B)*.

G.4 Prosedur kerja

G.4.1 Ekstraksi contoh

- a) timbang 1,0 g \pm 0,01 g contoh yang sudah dihaluskan lalu masukkan ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan 10 mL metanol, kemudian kocok selama 5 menit sampai homogen;
- b) sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 $\times g$, selama 10 menit;
- c) pindahkan 100 μ L larutan di lapisan bagian atas ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian tambahkan 900 μ L *extraction solution* dan dikocok selama 1 menit sampai homogen. Ambil 50 μ L larutan untuk analisis *ELISA*;
- d) faktor pengenceran : 100.

G.5 Proses pengujian ELISA

- a) siapkan *microtiter plate* sesuai jumlah standar dan contoh yang akan diuji;
- b) masukkan 50 μ L masing-masing larutan standar melamin ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi;

- c) masukkan 50 μL masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula;
- d) tambahkan 50 μL enzim konjugat dan 50 μL *antibody solution* ke dalam setiap *well*;
- e) inkubasikan *microtiter plate* selama 30 menit pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C);
- f) buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu;
- g) bilas *microtiter plate* dengan 250 μL *washing buffer* sebanyak empat kali sampai lima kali;
- h) tambahkan 50 μL *solution A* dan 50 μL *solution B* ke dalam masing-masing *well*, lakukan inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- i) tambahkan 50 μL *stop solution* ke dalam setiap *well*;
- j) homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual;
- k) baca absorbans setiap *well* dengan *microtiter plate reader (ELISA reader)* pada panjang gelombang 450 nm dengan segera.

CATATAN Prosedur kerja disesuaikan dengan kit yang digunakan.

G.6 Perhitungan

- a) kurva kalibrasi standar melamin dapat dibuat dari pembacaan % absorbans setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/mL pada kurva logaritma;

$$\text{Absorbans (\%)} = \frac{\text{absorbans standar atau contoh}}{\text{absorbans standar 0 (B0)}} \times 100 \quad (15)$$

- b) masukkan hasil pembacaan % absorbans contoh ke dalam kurva kalibrasi standar;
- c) nilai konsentrasi melamin pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam $\mu\text{g/kg}$ setelah dikalikan faktor pengenceran 100.

G.7 Penulisan hasil uji

- a) hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- b) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35
15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36
15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) hasil tidak terdeteksi (tt), jika hasil uji yang diperoleh dibawah nilai $\text{CC}\beta$ (< 0,5 dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 2,5 mg/kg).

Lampiran H
(normatif)
Metode uji kestabilan pakan dalam air

H.1 Prinsip

Kehilangan bobot pada perendaman dalam air dengan kondisi tertentu dianggap sebagai kadar kestabilan dalam air.

H.2 Peralatan

- a) aerator;
- b) akuarium;
- c) cawan porselen;
- d) keranjang kawat (*wire basket*), *mesh size* 1 mm;
- e) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) oven.

H.3 Cara kerja

- a) keringkan cawan dalam oven pada suhu 105 °C kemudian timbang hingga bobot konstan;
- b) timbang contoh yang telah diketahui kadar airnya dan masukkan ke dalam keranjang kawat;
- c) rendam keranjang kawat yang telah berisi contoh ke dalam akuarium yang berisi air, berikan aerasi dengan batu aerator diletakkan pada dasar akuarium;
- d) lakukan perendaman selama 15 menit untuk pakan apung dan 5 menit untuk pakan tenggelam;
- e) angkat keranjang kawat lalu pindahkan contoh ke dalam cawan yang telah dikeringkan sesuai poin a;
- f) keringkan cawan pada suhu 105 °C, kemudian timbang hingga bobot konstan;
- g) lakukan pengujian minimal duplo.

H.4 Perhitungan

$$\text{Nilai kestabilan pakan dalam air (\%)} = \frac{B}{(A \times (1-C))} \times 100 \quad (16)$$

Keterangan:

A adalah bobot contoh awal (g)

B adalah bobot contoh kering setelah perendaman (g)

C adalah kadar air

Nilai kestabilan pakan dalam air merupakan rata-rata dari duplo.

**Lampiran I
(normatif)
Metode uji kadar nitrogen bebas**

I.1 Prinsip

Senyawa nitrogen yang terdapat dalam contoh diuraikan oleh NaOH, kemudian amonia yang dibebaskan diikat dengan asam borat dan dititar dengan larutan asam standar.

I.2 Peralatan

- a) buret 25 mL;
- b) gelas piala;
- c) labu *Erlenmeyer* 250 mL;
- d) labu takar;
- e) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) unit distilasi.

I.3 Pereaksi

- a) air distilasi;
- b) alkohol 95%;
- c) asam borat (H_3BO_3) 2%;
- d) asam klorida (HCl) 0,1 N;
- e) indikator bromokresol 0,1%;
- f) indikator fenolftalein;
- g) indikator metil merah 0,1%;
- h) larutan asam borat indikator (500 mL asam borat 2% dicampur dengan 5 mL larutan indikator);
- i) larutan indikator (10 mL bromokresol 0,1% dicampur dengan 2 mL metil merah 0,1%) dalam alkohol 95%;
- j) natrium hidroksida (NaOH) 30%.

I.4 Cara kerja**I.4.1 Distilasi**

- a) timbang contoh sebanyak $5\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ dan masukkan ke dalam labu didih 250 mL;
- b) tambahkan 100 mL air distilasi dan 10 mL NaOH 30%;
- c) lakukan distilasi selama 5 menit;
- d) siapkan penampung labu *Erlenmeyer* yang berisi 10 mL larutan H_3BO_3 2% yang telah dicampur larutan indikator.

I.4.2 Titrasi

- a) lakukan titrasi terhadap distilat contoh dan blanko menggunakan larutan HCl 0,1 N;
- b) titik akhir titrasi ditandai dengan adanya perubahan warna pertama kali.

I.4.3 Perhitungan

$$\text{Nitrogen bebas (\%)} = \frac{(V_c - V_b) \times N \times 0,014}{w} \times 100 \quad (17)$$

Keterangan:

- V_c adalah volume larutan HCl pada titrasi contoh (mL)
 V_b adalah volume larutan HCl pada titrasi blanko (mL)
 N adalah normalitas larutan HCl (mol/L)
 W adalah bobot contoh (g)
 0,014 adalah nilai konstanta dari bobot atom nitrogen (g/mol)

Bibliografi

- [1] SNI 2354.9:2009. Cara uji kimia - Bagian 9: Penentuan residu kloramfenikol dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan.
- [2] SNI 8092:2015. Penentuan kadar tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin pada ikan dengan metode liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).
- [3] Barbosa J., Moura S., Barbosa R., Ramos F. 2007. Maria Irene Noronha da Silveira Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 586 (2007): 359–365.
- [4] Commision Directive 2002/32/EC. On undesirable substance in animal feed. The European Parliament and The Council
- [5] Commission Regulation (EU) 2017/2229 4 December 2017 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for lead, mercury, melamine and decoquinate.
- [6] Li J., Liu X.J., Wang P.J.2009. Multidetermination of Four Nitrofurans in Animal feeds by a Sensitive and Simple Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Agric. Food. Chem.* 57: 2181-2185.

Informasi perumus SNI 9043-13:2024

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Nono Hartanto
Wakil Ketua : Iman Indrawarman Barizi
Sekretaris : Lutfi Hardian Murtiono
Anggota : Nana Sarip Sumarna Udi Putra
Anggota : Alimuddin
Anggota : Tatag Budiardi
Anggota : Dedi Jusadi
Anggota : Alfida Ahda
Anggota : Heny Budi Utari
Anggota : Iskandar Ismanadji
Anggota : Deni Rusmawan
Anggota : Denny D. Indradjaja
Anggota : Azam B. Zaidy
Anggota : Deny Mulyono
Anggota : Hardi Pitoyo

[3] Konseptor Rancangan SNI

Damang Suryanto, S.St.Pi., M.P, Balai Besar Perikanan Budi Daya Air Payau Jepara

[4] Sekretariat Pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

Direktorat Perbenihan, Direktorat Jenderal Perikanan Budi Daya, Kementerian Kelautan dan Perikanan.