

RSNI3

Rancangan Standar Nasional Indonesia 3

Metode pengujian dengan *high-performance liquid chromatography* (HPLC) – Bagian 4: Deteksi residu hormon trenbolon asetat dalam daging dan hati sapi/kerbau

Apabila diketahui RSNI ini mengandung hak kekayaan intelektual, pihak yang berkepentingan diminta untuk memberikan informasi beserta data pendukung (pemilik hak kekayaan intelektual, bagian yang terkena hak kekayaan intelektual, alamat pemberi hak kekayaan intelektual, dan lain-lain).

Daftar Isi

Daftar Isi i

Prakata ii

Pendahuluan iii

1 Ruang lingkup..... 1

2 Acuan normatif..... 1

3 Istilah dan definisi 1

4 Singkatan..... 1

5 Prinsip..... 2

6 Bahan 2

7 Peralatan 2

8 Prosedur 3

9 Pelaksanaan pengujian..... 4

Tabel 1 – Larutan campuran standar kerja TBA dan 17 α -trenbolon atau TBA dan 17 β -trenbolon..... 3

Prakata

SNI 7541-4:202X Metode pengujian dengan *high-performance liquid chromatography (HPLC)* – *Bagian 4: Deteksi residu hormon trenbolon asetat dalam daging dan hati sapi/kerbau* yang dalam bahasa Inggris berjudul *High-performance liquid chromatography (HPLC) Method – Part 4: Detection of trenbolone acetate hormone residue in bovine meat and liver* merupakan standar revisi dari SNI 7541.4:2010, *Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) - Bagian 4: Residu hormon trenbolon dan dietilstilbestrol dalam daging, jeroan dan olahannya*. Standar ini disusun dengan jalur pengembangan sendiri dan ditetapkan oleh BSN Tahun 202X.

Perubahan dalam Standar ini meliputi:

1. Judul;
2. Ruang lingkup; dan
3. Penyempurnaan metode uji.

Standar ini merupakan bagian dari seri SNI 7541 Metode pengujian dengan *high-performance liquid chromatography (HPLC)*, yang terdiri atas beberapa bagian yaitu:

Bagian 1: Residu kloramfenikol dalam daging, telur, susu, dan olahannya.

Bagian 2: Residu golongan tetrasiklin dalam daging, telur, susu, dan olahannya.

Bagian 3: Residu golongan sulfonamida dalam daging, telur, susu, dan olahannya.

Bagian 4: Deteksi residu hormon trenbolon asetat dalam daging dan hati sapi/kerbau.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-20 Kesehatan Masyarakat Veteriner. Standar ini telah disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 16 Juli 2024 di Bekasi secara *hybrid*, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar. Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal ----- sampai dengan ----- dan 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

Pangan asal hewan mempunyai peranan penting dalam memenuhi protein hewani, karena mengandung asam amino esensial yang dibutuhkan manusia. Keamanan dan mutu pangan asal hewan perlu menjadi perhatian sebagaimana deklarasi WHO tahun 2003 yang menyatakan bahwa setiap manusia berhak mendapatkan pangan asal hewan yang aman dan layak untuk dikonsumsi. Hal tersebut selaras dengan Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan Juncto Undang-Undang Nomor 41 Tahun 2014 tentang Perubahan Atas Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan dalam Pasal 58 ayat (1) bahwa dalam rangka penjaminan produk hewan yang aman, sehat, utuh, dan halal (ASUH) Pemerintah dan pemerintah daerah berkewajiban melakukan pengawasan, pemeriksaan, pengujian, standardisasi, sertifikasi, dan registrasi produk hewan. Selanjutnya dalam Pasal 51 ayat (3) dinyatakan bahwa setiap orang dilarang menggunakan obat hewan tertentu pada ternak yang produknya untuk konsumsi manusia, yaitu obat hewan yang mengakibatkan terjadinya residu pada produk hewan dan mengakibatkan gangguan kesehatan pada orang yang mengonsumsi produk hewan.

Dalam rangka penjaminan keamanan dan mutu pangan asal hewan perlu dilakukan pengujian laboratorium dengan menggunakan metode uji yang terstandardisasi. Metode ini mengacu pada sejumlah dokumen dari organisasi internasional, peraturan perundangan yang berlaku, dan pustaka lain yang telah dipublikasikan.

Metode pengujian dengan *high-performance liquid chromatography* (HPLC) – Bagian 4: Deteksi residu hormon trenbolon asetat dalam daging dan hati sapi/kerbau

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode uji residu hormon trenbolon asetat dan metabolitnya dalam daging dan hati sapi/kerbau secara kuantitatif dengan menggunakan *high-performance liquid chromatography* (HPLC).

2 Acuan normatif

Tidak ada acuan normatif dalam dokumen ini.

3 Istilah dan definisi

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

3.1

residu hormon

senyawa utama dan/atau metabolitnya yang terkandung dalam daging dan/atau hati sapi/kerbau, baik sebagai akibat langsung maupun tidak langsung dari penggunaan hormon

3.2

daging

bagian otot skeletal dari karkas sapi/kerbau yang aman, layak, dan lazim dikonsumsi oleh manusia

CATATAN Daging dapat berupa daging hangat (*hot meat*), daging segar dingin (*chilled fresh meat*), atau daging beku (*frozen meat*).

3.3

hati

organ dari hewan sapi/kerbau yang aman, layak, dan lazim dikonsumsi oleh manusia

CATATAN Hati dapat berupa hati hangat (*hot liver*), hati segar dingin (*chilled fresh liver*), atau hati beku (*frozen liver*).

4 Singkatan

HPLC = *high-performance liquid chromatography*;

UPW = *ultrapure water*;

LC = *lichrosolv*;

PTFE = *polytetrafluoroethylene*

TBA = trenbolon asetat

5 Prinsip

Residu hormon diekstraksi/dipisahkan dari matriks contoh uji dengan menggunakan pereaksi organik (asetonitril) dan dipekatkan hingga kering, kemudian residu dilarutkan dalam metanol 10%. Pembersihan/pemurnian dilakukan dengan menggunakan *mini column cartridge* C18. Penetapan secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 340 nm, kolom yang digunakan fase terbalik (*reversed phase*) C18, fase gerak berupa campuran larutan asetonitril LC *grade*, metanol LC *grade*, UPW dengan perbandingan 5:1:4, kecepatan rata-rata (*flow rate*) sebesar 1 ml/menit, dengan menggunakan alat *high-performance liquid chromatography* (HPLC).

6 Bahan

6.1 Standar baku pembanding

Trenbolon asetat (TBA), 17α -trenbolon, dan 17β -trenbolon.

6.1.1 Standar baku pembanding yang digunakan untuk contoh uji daging adalah TBA dan 17β -trenbolon.

6.1.2 Standar baku pembanding yang digunakan untuk contoh uji hati adalah TBA dan 17α -trenbolon.

6.2 Pereaksi

- a) asetonitril;
- b) asetonitril LC *grade*;
- c) metanol;
- d) metanol LC *grade*;
- e) n-heksana;
- f) n-propanol;
- g) *ultrapure water* (UPW); dan
- h) air distilasi atau akuabides atau air dengan *grade* yang setara atau lebih (contoh: air demineralisasi, *reverse osmosis water*).

7 Peralatan

- a) alat HPLC;
- b) kolom HPLC fase terbalik (*reversed phase*) C18;
- c) *mini column cartridge* C18;
- d) *rotary evaporator*;
- e) *homogenizer*;
- f) sonikator;
- g) timbangan analitik;
- h) vial HPLC;
- i) labu pemisah/labu kocok 250 ml;
- j) pipet volumetrik 2 ml, 10 ml dan 20 ml;
- k) labu evaporasi 50 ml dan 250 ml;
- l) labu ukur 20 ml;
- m) corong gelas;
- n) botol timbang;
- o) *disposable syringe* 1 ml;

- p) filter PTFE (0,45 μm , 13 mm); dan
q) kertas saring Nomor 1.

8 Prosedur

8.1 Larutan stok standar TBA, 17 α -trenbolon, dan 17 β -trenbolon

Penimbangan stok standar harus dilakukan dalam ruang timbang pada suhu ≤ 25 °C dan kelembaban $\leq 50\%$.

8.2 Prosedur pembuatan larutan

8.2.1 Pembuatan larutan stok standar TBA, 17 α -trenbolon, dan 17 β -trenbolon

- Sebelum membuat larutan standar TBA, 17 α -trenbolon, dan 17 β -trenbolon, terlebih dahulu lakukan pengecekan potensi standar yang tertera pada label kemasan standar tersebut. Timbang standar tersebut dalam botol timbang.
- Buat larutan stok standar dengan konsentrasi 1.000.000 ng/ml dengan volume minimum 4 ml.

CONTOH Apabila standar TBA, 17 α -trenbolon, atau 17 β -trenbolon mempunyai potensi 98%, maka untuk membuat larutan standar 1.000.000 ng/ml, diperlukan 4,9 mg (5 mg x 98%) standar tersebut dalam 4,9 ml asetonitril LC *grade*.

8.2.2 Pembuatan larutan campuran standar kerja

- Pipet masing-masing 2 ml larutan stok standar TBA dan 17 α -trenbolon atau TBA dan 17 β -trenbolon dengan menggunakan pipet volumetrik, kemudian masukkan ke dalam labu ukur untuk pembuatan larutan campuran standar kerja.
- Encerkan hingga 20 ml dengan larutan fase gerak sehingga diperoleh larutan campuran standar kerja 100.000 ng/ml, kocok hingga homogen.
- Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 62,5 ng/ml.
- Larutan campuran standar kerja mengacu pada Tabel 1.

Tabel 1 – Larutan campuran standar kerja TBA dan 17 α -trenbolon atau TBA dan 17 β -trenbolon

Konsentrasi awal (ng/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi akhir (ng/ml)
1.000.000	2	20	100.000
100.000	2	20	10.000
10.000	2	20	1.000*)
1.000	10	20	500*)
500	10	20	250*)
250	10	20	125*)
125	10	20	62,5*)

KETERANGAN

*) konsentrasi yang digunakan sebagai larutan campuran standar kerja untuk pembuatan kurva linearitas.

8.2.3 Larutan n-heksana jenuh

Campurkan asetonitril dan n-heksana dengan perbandingan 1:1 ke dalam labu pemisah. Homogenkan dengan dikocok perlahan dan sesekali membuka tutup labu pemisah untuk mengeluarkan gas yang terbentuk. Biarkan beberapa menit hingga campuran terpisah. Pisahkan dan tampung fraksi heksana jenuh (lapisan atas) ke dalam botol.

8.2.4 Larutan metanol 10%

Ambil 10 ml metanol menggunakan pipet volumetrik, kemudian tambahkan dengan air distilasi hingga volume 100 ml.

8.2.5 Larutan metanol 40%

Ambil 40 ml metanol menggunakan pipet volumetrik, kemudian tambahkan dengan air distilasi hingga volume 100 ml.

8.2.6 Larutan metanol 80%

Ambil 80 ml metanol menggunakan pipet volumetrik, kemudian tambahkan dengan air distilasi hingga volume 100 ml.

8.2.7 Larutan fase gerak

Buat campuran larutan yang terdiri atas asetonitril LC *grade*, metanol LC *grade*, dan UPW dengan perbandingan 5:1:4. Homogenkan dengan dikocok perlahan kemudian masukkan botol ke dalam sonikator. Lakukan sonikasi hingga tidak terbentuk gelembung udara.

9 Pelaksanaan pengujian

9.1 Cara kerja

- a) Timbang contoh uji (10 g daging sapi/kerbau atau 5 g hati sapi/kerbau) dalam botol timbang, kemudian homogenkan dengan *homogenizer*.
- b) Tambahkan 30 ml asetonitril, kocok selama 5 menit. Saring dengan menggunakan corong gelas yang dilapisi dengan kertas saring Nomor 1, diperoleh Filtrat 1.
- c) Ulangi cara kerja pada huruf b, sehingga diperoleh Filtrat 2.
- d) Gabungkan Filtrat 1 dan Filtrat 2 dalam labu pemisah, tambahkan 50 ml n-heksana jenuh, dan kocok selama 5 menit kemudian diamkan beberapa saat sampai fase larutan terpisah. Lapisan atas (larutan n-heksana) dan lapisan bawah (larutan asetonitril).
- e) Tampung lapisan bawah ke dalam labu evaporasi 250 ml, tambahkan 10 ml n-propanol, lalu evaporasi menggunakan *rotary evaporator* dalam kondisi vakum pada suhu 40 °C.
- f) Larutkan hasil evaporasi pada poin e dalam 10 ml metanol 10%, lalu sonikasi sampai terlarut sempurna.
- g) Aktivasi *mini column cartridge* C18 dengan cara basahi menggunakan 10 ml metanol dan 10 ml air distilasi.
- h) Lewatkan larutan yang diperoleh pada poin f melalui *mini column cartridge* C18 yang sudah diaktivasi.
- i) Cuci *mini column cartridge* C18 secara perlahan-lahan dengan menggunakan 10 ml metanol 40% (2 kali untuk daging sapi/kerbau dan 3 kali untuk hati sapi/kerbau).

- j) Elusi perlahan-lahan dengan 5 ml metanol 80% dua kali dan tampung larutan hasil elusi ke dalam labu evaporasi 50 ml, lalu evaporasi sampai kering.
- k) Larutkan hasil evaporasi pada poin j dalam 1 ml larutan fase gerak, saring dengan *syringe* filter PTFE (0,45 µm, 13 mm) dan masukkan ke dalam vial HPLC.
- l) kondisikan alat HPLC sebagai berikut:
 - (1) kecepatan alir : 1 ml/menit
 - (2) fase gerak : asetonitril LC *grade* : metanol LC *grade* : UPW (dengan perbandingan 5:1:4)
 - (3) panjang gelombang : 340 nm
 - (4) kolom : fase terbalik (*reversed phase*) C18
- m) Injeksikan larutan campuran standar kerja secara berurutan ke alat HPLC yang telah kondisikan sehingga diperoleh kurva linearitas.
- n) Injeksikan larutan yang diperoleh dari poin k ke alat HPLC.

9.2 Pembacaan hasil

- a) Lakukan pengamatan terhadap grafik kromatogram.
- b) Residu hormon TBA dan 17 α -trenbolon atau TBA dan 17 β -trenbolon ditunjukkan dengan adanya “*peak*” pada kromatogram dengan waktu retensi (*retention time*) yang sama dengan waktu retensi standar. Untuk alat HPLC yang menggunakan detektor *diode array* perlu dilakukan konfirmasi spektrum dari kromatogram yang dihasilkan.
- c) Apabila area yang dihasilkan dari contoh uji melebihi area kurva kalibrasi, maka ekstrak contoh uji dapat diencerkan sampai diperoleh area dalam rentang kurva linearitas.

9.3 Perhitungan

Rumus:

$$\text{Kadar residu hormon TBA (ng/ml)} = \frac{FP \times C \times V}{W} \quad (1)$$

Keterangan:

- FP : Faktor pengenceran;
- C : Konsentrasi dalam larutan contoh uji yang terbaca di alat HPLC (ng/ml);
- V : Volume larutan contoh uji (ml);
- W : Berat contoh uji (g).

Bibliografi

- [1] Ginkel, L. A. V., Blitterswijk, H. V., Zoontjes, P. W., Bosch, D. V. D. and Stephany, R. W. Assay for trenbolone and its metabolite 17 α -trenbolone in bovine urine based on immunoaffinity chromatographic cleanup and off-line high performance liquid chromatography thin layer chromatography. *Journal of Chromatography*, 1988, 445: 385-392.
- [2] Hsu, S. S., Eckerlin, R. H. and Henion, J. D. Identification and quantitation of trenbolone in bovine tissue by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1988, 424: 219-229.
- [3] MacNeil, J.D., Reid, J., Neiser, C.D. and Fesser, A.C. Single-laboratory validation of a modified liquid chromatographic method with UV detection for determination of trenbolone residues in bovine liver and muscle. *Journal of AOAC International*, 2003, Sep-Oct;86(5):916-24. PMID: 14632391.
- [4] Miyazaki, T., Sasamoto, T., Hashimoto, T. and Kokubo, Y. Determination of anabolic agents in beef and milk by HPLC with photodiode array detection. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 1995, 36: 748-753.
- [5] Tsai C.F., Chang M.H., Pan J.Q, and Chou, S.S. A method for the determination of trenbolone in bovine muscle and liver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2004, 12(4):353-357.

Informasi Perumus SNI

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 65-20 Kesehatan Masyarakat Veteriner

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Fery Fahrudin Munier
Wakil Ketua : Endang Ekowati
Sekretaris : Aulia
Anggota : Nuraini Triwijayanti
Rini Prastyanty
Juniawati
Sri Usmiati
Denny Widaya Lukman
Hadri Latif
Ratih Dewanti
Retno Dewi Wiwiek Bagja
Kanti Puji Rahayu
Puji Rahayu
Thia Gaffiana
Achmad Fachmi
Akhmad Sawaldi

[3] Konseptor Rancangan SNI

1. Aulia
2. Puji Rahayu
3. Woro Dyah Pinilih
4. Hadri Latif
5. Endang Ekowati
6. Dyah Ayu Widiasih
7. Rachmat Firmansyah
8. Nur Sabiq Assadah
9. Inggarsetya Syah Audini
10. Lynda Nugrahaning Imanjati
11. Dyah Ayu Kurniawati
12. Dianita Dwi Sugiartanti
13. Zaki Aminullah
14. Mutia Nur Fitriani

[4] Sekretariat Pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

Balai Besar Pengujian Standar Instrumen Veteriner
Badan Standardisasi Instrumen Pertanian Kementerian Pertanian