

ESTIMASI NILAI KETIDAKPASTIAN PENGUKURAN PADA PENENTUAN POTENSI OKSITETRASIKLIN SEDIAAN INJEKSI DENGAN *BIOASSAY*

Nurhidayah, Maria Fatima Palupi, Novida Ariany, Eli Nugraha

Unit Uji Farmasetik dan Premiks

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340

ABSTRAK

Penentuan potensi oksitetrasiklin sediaan injeksi dengan metode uji *Bioassay* merupakan salah satu pengujian yang rutin dilakukan di Unit Uji Farmasetik dan Premiks, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPM SOH). Sebagai laboratorium terakreditasi dan salah satu persyaratan penerapan sistem manajemen mutu SNI ISO/IEC 17025:2008, maka telah dilakukan perhitungan estimasi ketidakpastian dari pengukuran potensi oksitetrasiklin sediaan injeksi dengan metode *Bioassay*. Berdasarkan perhitungan ketidakpastian gabungan dengan faktor cakupan $k = 2$ dan tingkat kepercayaan 95% diperoleh nilai ketidakpastiannya sebesar $\pm 0,24\%$. Nilai ini diartikan bahwa potensi oksitetrasiklin pada obat hewan sediaan injeksi adalah 99,89% dan nilai sebenarnya terletak diantara $(99,89 \pm 0,24) \%$.

Kata kunci: *estimasi ketidakpastian, uji potensi, oksitetrasiklin, bioassay,*

ABSTRACT

Determination of oxytetracycline injection preparation potency using bioassay method is one of the routine tests carried out in Pharmaceutical and Premix Assay Unit, National Veterinary Drug Assay Laboratory (NVDAL). As an accredited laboratory and one of the requirements of the quality management system SNI ISO/IEC 17025:2008, an estimation of uncertainty measurement of oxytetracycline potency in injection preparation using bioassay has been conducted. Based on calculation of combined uncertainty with the coverage factor $- 2$ and confidence level 95%, it was obtained that the uncertainty measurement was $\pm 0,24\%$. This value means that oxytetracycline potency in injection preparation was 99,89% and true value ranged between $(99,89 \pm 0,24) \%$.

Key words: *uncertainty measurement, potency test, oxytetracycline, bioassay*

PENDAHULUAN

Penentuan potensi oksitetrasiklin pada obat hewan sediaan injeksi merupakan salah satu pengujian yang rutin dilakukan di Unit Uji Farmasetik dan Premiks, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH). Penentuan potensi tersebut dilakukan dengan menggunakan metode *Bioassay* sesuai dalam FOHI Jilid II Edisi 4 Tahun 2009⁽²⁾. Oksitetrasiklin sediaan injeksi merupakan salah satu jenis obat hewan yang cukup banyak beredar di Indonesia, baik lokal maupun impor. Potensi oksitetrasiklin dalam obat hewan diukur dalam upaya pemberian pelaksanaan sertifikasi, pelayanan jasa, pemantauan maupun pengamanan mutu produk obat hewan.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) merupakan laboratorium pengujian yang telah terakreditasi dan menerapkan sistem manajemen mutu dengan acuan SNI ISO/IEC 17025:2008. Pada acuan SNI ISO/IEC 17025:2008 butir 5.4.6 menyebutkan bahwa laboratorium pengujian harus mempunyai dan menerapkan prosedur untuk mengestimasi ketidakpastian pengukuran (*uncertainty*)⁽¹⁾.

Ketidakpastian pengukuran (*uncertainty*) adalah suatu rentang nilai dimana disekitar nilai hasil pengukuran tersebut terdapat nilai sebenarnya dari besaran ukur. Nilai ketidakpastian merupakan suatu parameter yang selalu menyertai dalam suatu alat yang digunakan untuk pengukuran di dalam laboratorium pengujian. Ketidakpastian pengukuran memadukan semua kesalahan yang dilakukan menjadi suatu rentang tunggal pengukuran⁽³⁾.

Sumber-sumber ketidakpastian diantaranya yaitu *sampling*, kondisi penyimpanan, alat/instrument, kemurnian reagen atau standar, preparasi contoh, penimbangan, kalibrasi alat, standar atau reagent yang digunakan, metode-

metode yang belum valid, kapabilitas personil, pembacaan data, atau pengamatan^(3,4). Ada 2 kategori komponen ketidakpastian, yaitu tipe A (*random error*) yang berdasarkan pekerjaan eksperimental dan dihitung dari rangkaian pengamatan berulang, dan tipe B (*systematic error*) yang berdasarkan informasi yang dapat dipercaya, seperti dari spesifikasi pabrik, buku literatur, jurnal, dan sebagainya⁽⁶⁾.

Nilai ketidakpastian dapat menjadi indikator untuk menilai kualitas dari suatu hasil pengujian/pengukuran antara lain antara lain untuk mengevaluasi reliabilitas hasil, untuk membuat perbandingan yang valid antara dua hasil atau lebih, mengevaluasi tingkat keyakinan terhadap keputusan yang akan diambil berdasarkan data tersebut, dan untuk menilai apakah hasil pengukuran/pengujian tersebut sesuai dengan tujuan penggunaannya. Ketidakpastian pengukuran hasil pengujian juga dapat diminta oleh pengguna jasa laboratorium^(4,6).

Oleh karena itu BBPMSOH khususnya Unit Uji Farmasetik dan Premiks melakukan estimasi ketidakpastian (*uncertainty*) dari pengukuran potensi oksitetrasiklin pada obat hewan sediaan injeksi dengan menggunakan metode *Bioassay* dengan tujuan untuk mengetahui suatu rentang nilai pengukuran potensi oksitetrasiklin dimana diantara rentang nilai tersebut terdapat nilai yang sebenarnya dari besaran yang diukur.

MATERI DAN METODE

MATERI

1. Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik (Shimadzu, *Japan*), timbangan elektrik (Libror, *Japan*), labu ukur, tabung reaksi, kertas timbang, sendok timbang, *vortex*, *magnetic*

stirrer, inkubator, pipet ukur, pipet tetes, cawan petri, *silinder cup*, *silinder dropper* dan *kaliper*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel obat hewan oksitetrasiklin sediaan injeksi standar oksitetrasiklin (*Sigma-Aldrich, Germany*), *destilled water* (DW), *Buffer* No.1, *Media* No.5 yang mengandung kuman uji *M. luteus* 9341 10%.

METODE

Metode *Bioassay* digunakan untuk penetapan potensi oksitetrasiklin dalam sediaan injeksi obat hewan sesuai dengan FOHI jilid II Edisi 4 Tahun 2009 hal 234-235, 501-507 dan IKP FAR.601.

1. Preparasi standar

Standar oksitetrasiklin ditimbang dan kemudian dilarutkan dengan *buffer* No.1 sehingga diperoleh standar konsentrasi 1000 µg/mg. Sebanyak 1 mL Larutan standar tersebut diencerkan dengan 9 mL *buffer* No.1 sehingga didapatkan konsentrasi 100 µg/mg. Selanjutnya standar konsentrasi 100 µg/mg sebanyak 4 mL diencerkan dengan 6 mL *buffer* No.1 sehingga didapatkan konsentrasi 40 µg/mg (standar kadar tinggi/SH). Kemudian standar kadar tinggi sebanyak 5 mL diencerkan dengan 15 mL *buffer* No.1 sehingga diperoleh konsentrasi 10 µg/mg (standar kadar rendah/SL).

2. Preparasi sampel

Sampel obat hewan (mengandung oksitetrasiklin 200 mg/mL) sediaan injeksi diambil sebanyak 1 mL dan dilarutkan dengan *destilled water* dalam labu takar 100 mL. Larutan sampel tersebut diambil sebanyak 1 mL dan diencerkan dengan 9 mL *buffer* No.1 hingga didapatkan konsentrasi 200 µg/mg. Selanjutnya sampel konsentrasi 200 µg/mg sebanyak 2 mL diencerkan dengan 8 mL *buffer* No.1 sehingga

didapatkan konsentrasi 40 µg/mg (sampel kadar tinggi/UH). Kemudian sampel kadar tinggi sebanyak 5 mL diencerkan dengan 15 mL *buffer* No.1 sehingga diperoleh konsentrasi 10 µg/mg (sampel kadar rendah/UL).

3. Penetapan Potensi

Larutan standar (SH dan SL) dan larutan sampel (UH dan UL) diteteskan dengan pipet tetes pada masing-masing silinder yang telah diletakkan diatas media biakan pada cawan petri, lalu dilakukan inkubasi pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ selama 10-18 jam. Garis tengah daerah hambatan yang terbentuk kemudian diukur dengan menggunakan kaliper. Potensi oksitetrasiklin pada sediaan obat hewan dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Log } P = \frac{(UH + UL) - (SH + SL)}{(UH + SH) - (UL + SL)} \times \text{Log } 4$$

P = Potensi (%)

SH = Diameter daerah hambatan yang ditimbulkan antibiotika standar kadar tinggi

UH = Diameter daerah hambatan yang ditimbulkan antibiotika sampel kadar tinggi

SL = Diameter daerah hambatan yang ditimbulkan antibiotika standar kadar rendah

UL = Diameter daerah hambatan yang ditimbulkan antibiotika sampel kadar rendah

4. Estimasi Ketidakpastian

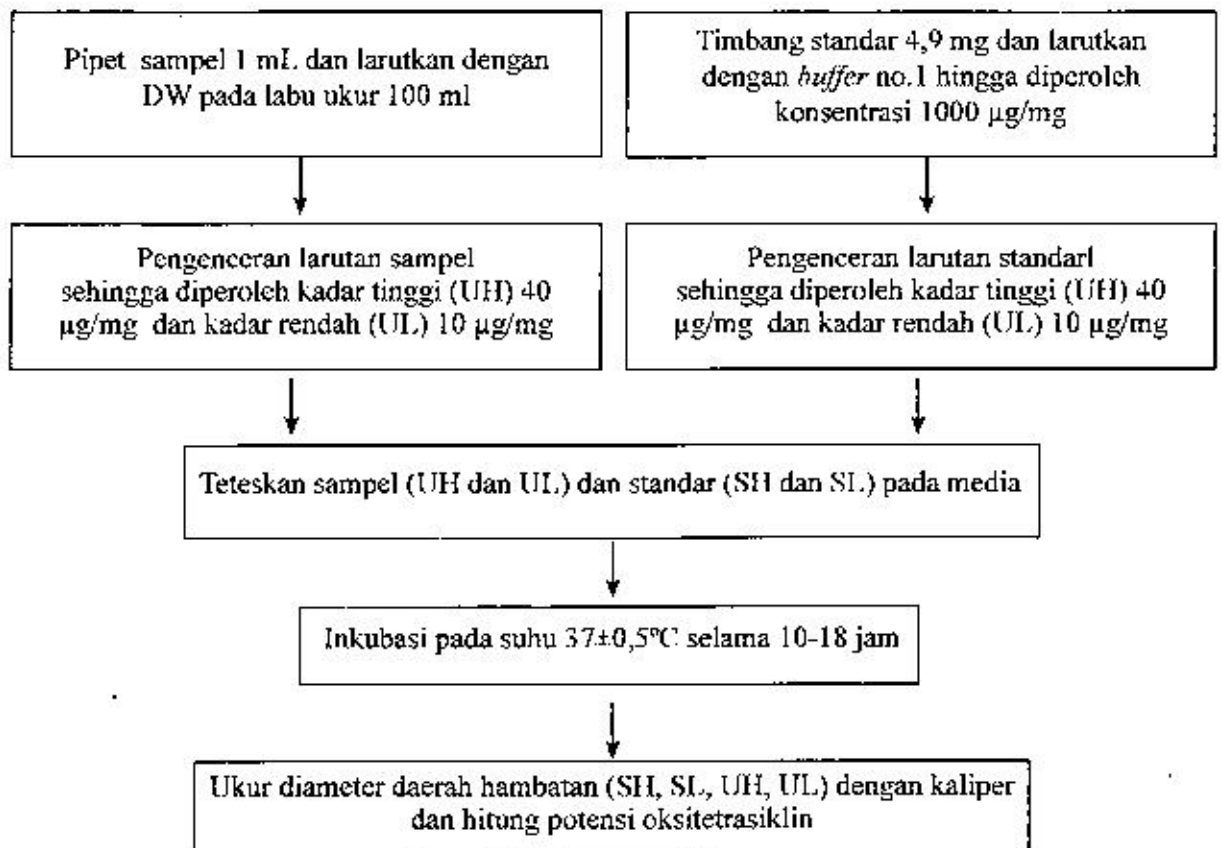
Adapun langkah-langkah yang dilakukan untuk menentukan nilai estimasi ketidakpastian pengukuran adalah sebagai berikut:

- Membuat model alur pengujian.
- Definisikan besaran yang diukur yang dinyatakan dengan rumus.
- Identifikasi sumber atau faktor yang mempengaruhi ketidakpastian.

- d. Membuat *Cause and effect diagram/ fishbone*.
 - e. Mengelompokkan faktor-faktor ketidakpastian ke dalam kategori komponen ketidakpastian.
 - f. Mengestimasi masing-masing komponen ketidakpastian (μ).
 - g. Ketidakpastian gabungan
 - h. Ketidakpastian diperluas (*expanded uncertainty*)⁽⁵⁾.
- daya hambat antibiotika standar. Estimasi ketidakpastian pengukuran pada penentuan potensi oksitetrasiklin sediaan obat hewan injeksi dengan metode *Bioassay* telah dilakukan menurut kaidah dan langkah-langkah yang telah ditentukan, yaitu mulai dari membuat model pengujian sampai diperolehnya nilai estimasi ketidakpastian yang diperluas.

Model Pengujian dan Formulasi Rumus

Dalam upaya melakukan spesifikasi kuantitas yang diukur (*measurand*), maka pembuatan model pengujian berupa diagram alir dapat membantu memahami prosedur pengujian dan melihat faktor-faktor yang dapat berkontribusi pada ketidakpastian. Kemudian dilakukan penulisan dan pengecekan kembali rumus perhitungan yang digunakan untuk mendapatkan *measurand*. Adapun model alur pengujian potensi oksitetrasiklin dengan metode *Bioassay* tersebut dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 1. Model Sistem Pengujian Potensi Oksitetrasiklin dengan metode *Bioassay*

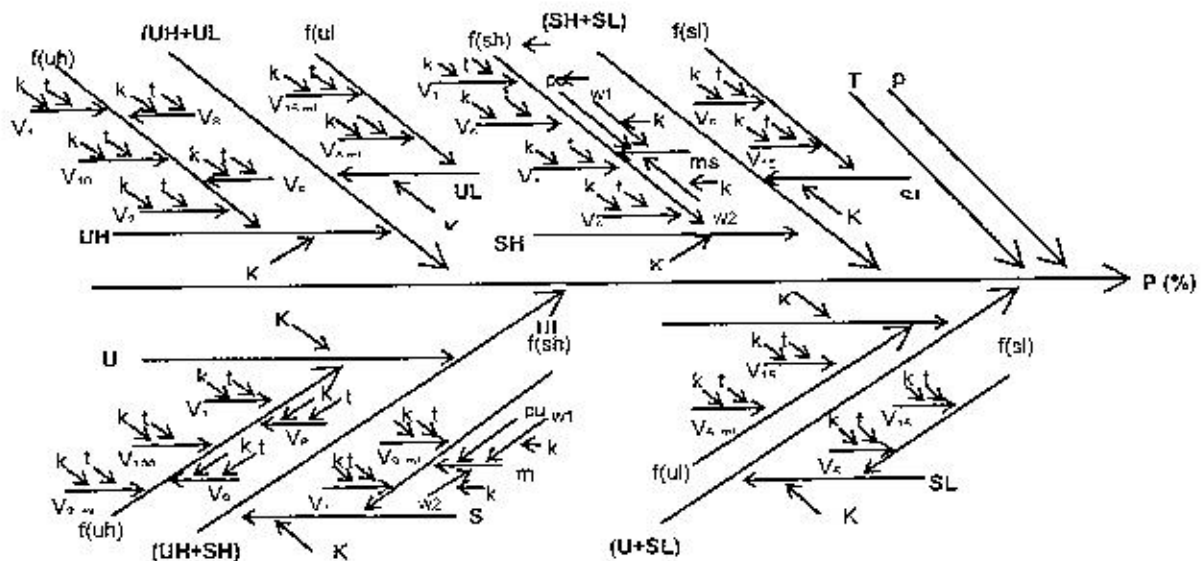
Hasil uji potensi oksitetrasiklin sediaan injeksi dengan metode *Bioassay* dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Log } P = \frac{(UH + UL) - (SH + SL)}{(UH + SH) - (UL + SL)} \times \text{Log } 4$$

Pada formulasi rumus terdapat parameter yang memiliki ketidakpastian dan menjadi sumber ketidakpastian yang utama, serta dapat mempermudah mengidentifikasi faktor-faktor yang mempengaruhi ketidakpastian.

2. Diagram Cause Effect/Fishbone

Diagram *Cause Effect/Fishbone* dibuat berdasarkan formulasi rumus yang digunakan dan hasil dari identifikasi faktor-faktor yang menjadi sumber ketidakpastian. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi ketidakpastian yang dapat memberikan kontribusi kesalahan terhadap hasil pengujian *Bioassay* diantaranya yaitu pengenceran sampel dan standar, penimbangan standar, pengukuran diameter daerah hambatan, suhu inkubasi serta presisi



Gambar 2. Diagram Cause Effect/Fishbone

Sumber atau faktor-faktor ketidakpastian tersebut kemudian dikelompokkan ke dalam 2 tipe kategori yaitu tipe A dan Tipe B. Kategori tipe A adalah ketidakpastian efek acak (random) dan berdasarkan asumsi distribusi normal, yaitu berdasarkan pekerjaan eksperimental dan dihitung dari rangkaian pengamatan berulang. Kesalahan dengan kategori tipe B adalah evaluasi ketidakpastian yang berasal dari efek acak dan sistematis dan merupakan kutipan ketidakpastian (*quoted uncertainty*) yang diperoleh dari sumber informasi yang dapat dipercaya seperti sertifikat, spesifikasi pabrik, handbook dan lain-lain.

3. Estimasi Masing-Masing Komponen Ketidakpastian (μ)

Ukuran diameter daerah hambatan dipengaruhi oleh konsentrasi tinggi dan rendah dari sampel dan standar, serta pengukuran diameter dengan kaliper. Estimasi ketidakpastian konsentrasi standar dan sampel berasal dari pengenceran standar dan sampel yang berasal dari labu takar dan pipet. Estimasi pengukuran ketidakpastian labu takar dan pipet digolongkan dalam komponen ketidakpastian tipe A, yaitu informasi spesifikasi pabrik. Menurut keterangan pabrik, labu takar dan pipet telah dikalibrasi

pada 20°C, dengan koefisien muai volume dari air adalah $0,00021^{\circ}\text{C}^{-1}$, sedangkan temperatur laboratorium bervariasi $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Berdasarkan rumus hitung potensi antibiotik dan diagram *Cause Effect/Fishbone*, maka estimasi masing-masing komponen ketidakpastian adalah sebagai berikut.

Tabel 1. Ketidakpastian pengukuran asal sampel kadar tinggi dan rendah (μ_{UH+UL}).

No.	Sumber Ketidakpastian	Nilai Ketidakpastian (μ)
1.	Estimasi Ketidakpastian asal sampel kadar tinggi (UH)	
	Pipet 1 mL	0,00579
	Labu Takar 100 mL	0,00075
	Pipet 2 mL	0,00293
	Pipet 8 mL	0,00152
	Pipet 9 mL	0,00137
	Kaliper	0,00040
	Ketidakpastian baku gabungan asal sampel kadar tinggi (μ_{UH})	0,00686
2.	Estimasi Ketidakpastian asal sampel kadar rendah (UL)	
	Pipet 5 mL	0,00579
	Pipet 15 mL	0,00091
	Kaliper	0,00051
	Ketidakpastian baku gabungan asal sampel kadar rendah (μ_{UL})	0,00588
3.	Ketidakpastian gabungan asal (μ_{UH+UL})	0,00913

Tabel 2. Ketidakpastian pengukuran asal standar kadar tinggi dan rendah (μ_{SH+SL}).

No.	Sumber Ketidakpastian	Nilai Ketidakpastian (μ)
1.	Estimasi Ketidakpastian asal standar kadar tinggi (SH)	
	Timbangan	0,03681
	Kemurnian standar	0,00583
	Pipet 1 mL	0,00579
	Pipet 6 mL	0,00199
	Pipet 4 mL	0,00222

	Pipet 9 mL	0,00137
	Kaliper	0,00040
	Ketidakpastian baku gabungan asal standar kadar tinggi (μ_{SH})	0,03786
2.	Estimasi Ketidakpastian asal standar kadar rendah (SL)	
	Pipet 5 mL	0,00579
	Pipet 15 mL	0,00091
	Kaliper	0,00051
	Ketidakpastian baku gabungan asal standar kadar rendah (μ_{SL})	0,00588
3.	Ketidakpastian gabungan asal (μ_{SH+SL})	0,03832

Tabel 3. Ketidakpastian pengukuran asal sampel dan standar kadar tinggi (UH+SH).

No.	Sumber Ketidakpastian	Nilai Ketidakpastian (μ)
1	Ketidakpastian baku gabungan asal sampel kadar tinggi (μ_{UH})	0,00686
2	Ketidakpastian baku gabungan asal standar kadar tinggi (μ_{SH})	0,04802
	Ketidakpastian gabungan asal (μ_{UH+SH})	0,04851

Tabel 4. Ketidakpastian pengukuran asal sampel dan standar kadar rendah (UL+SL).

No.	Sumber Ketidakpastian	Nilai Ketidakpastian (μ)
1	Ketidakpastian baku gabungan asal sampel kadar rendah (μ_{UL})	0,00588
2	Ketidakpastian baku gabungan asal standar kadar rendah (μ_{SL})	0,00588
	Ketidakpastian gabungan asal (μ_{UL+SL})	0,00832

Sampel dan standar yang ditetaskan pada media biakan menghasilkan daerah hambatan setelah diinkubasi pada suhu 37°C. Sertifikat kalibrasi inkubator diketahui $\pm 1,2^\circ\text{C}$ (95%) sehingga ketidakpastian asal inkubasi adalah sebagai berikut.

$$\mu_{1.1} = \frac{1,2}{1,96} = 0,6122^\circ\text{C}$$

Pencetakan potensi oksitetrasiklin bentuk sediaan injeksi dilakukan dengan melakukan pengujian potensi terhadap sampel sebanyak 6 kali pengulangan sehingga diperoleh SD = 0,1, CV =

$$0,1 (\%). \text{ Sehingga } \mu_p = \frac{0,10}{\sqrt{1}} = 0,10$$

Tabel 5. Ketidakpastian pengukuran asal presisi.

Pengulangan	Hasil Uji Potensi (%)
1	99,89
2	100,19
3	100,08
4	100,05
5	100,02
6	99,97
Rata-rata	100,03
SD	0,10

4. Ketidakpastian Gabungan Baku dan Ketidakpastian Diperluas

Langkah selanjutnya adalah menggabungkan masing-masing komponen ketidakpastian baku (μ) untuk menghasilkan ketidakpastian hasil pengujian secara keseluruhan (ketidakpastian gabungan baku).

Jika hasil pengujian potensi oksitetrasiklin sediaan injeksi dengan metode *bioassay* adalah 99.89% maka nilai ketidakpastiannya $\mu_{\text{Potensi}} = 0,12 \times 99,89\% = 0,12\%$

Ketidakpastian diperluas untuk mendapatkan probabilitas yang memadai bahwa nilai hasil uji berada dalam rentang yang diberikan oleh ketidakpastian, maka ketidakpastian baku gabungan (μ_{Gabungan}) dikalikan dengan faktor kecakupan (k). Faktor 2 memberikan ketidakpastian diperluas dengan tingkat kepercayaan 95%.

$$\begin{aligned} \frac{\mu_{\text{Potensi}}}{\text{Potensi}} &= \sqrt{\left(\frac{\mu_{\text{UH}} + \mu_{\text{L}}}{\text{UH} + \text{L}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{SH}} + \mu_{\text{SL}}}{\text{SH} + \text{SL}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{UL}} + \mu_{\text{L}}}{\text{UL} + \text{SL}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{UH}} + \mu_{\text{SH}}}{\text{UH} + \text{SH}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{L}}}{\text{L}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{P}}}{\text{P}}\right)^2} \\ &= \sqrt{(0,00913)^2 + (0,04838)^2 + (0,04851)^2 + (0,00832)^2 + (0,001655)^2 + (0,10)^2} \\ &= 0,11821\% \end{aligned}$$

$$U = k \cdot \mu \text{ (Gi)}$$

$$U = 2 \times 0,11821 = 0,24\%$$

Hasil perhitungan nilai ketidakpastian pengukuran pengujian potensi oksitetrasiklin sediaan injeksi dengan metode *bioassay* adalah $\pm 0,24\%$. Sehingga potensi oksitetrasiklin dalam

sediaan obat nilainya terletak diantara (99.89 $\pm$ 0.24)% yaitu dimana rentang nilai tersebut terdapat nilai yang sebenarnya dari besaran potensi yang diukur.

KESIMPULAN

1. Estimasi nilai ketidakpastian pengukuran pada pengujian potensi oksitetrasiklin dalam sediaan obat hewan injeksi dengan metode *Bioassay* perlu dilakukan untuk memenuhi jaminan mutu hasil pengujian.
2. Hasil pengujian potensi oksitetrasiklin dalam sediaan obat hewan injeksi dengan metode *Bioassay* adalah 99.89%.

Nilai ketidakpastian penentuan potensi oksitetrasiklin adalah $\pm 0.24\%$. Sehingga nilai potensi oksitetrasiklin terletak diantara $(99.89 \pm 0.24)\%$ yaitu dimana rentang nilai tersebut terdapat nilai sebenarnya dari besaran potensi yang diukur.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Anonymous.** 2008. SNI ISO/IEC 17025:2008 Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi. Badan Standarisasi Nasional.
2. **Anonymous.** 2009. Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid II Edisi 4 (Farmasetik dan Premiks). Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian Republik Indonesia.
3. **Birth, Keith.** 2003. *Measurement Good Practice Guide No.36 Estimating Uncertainty In Testing An Intermediate Guide to Estimating and Reporting Uncertainty of Measurement In Testing.* British Measurement and Testing Association. Addison-Weasley Publishing Company Inc. London.
4. **Ellison SLR, Williams A.** 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Third Edition. EURACHEM/CITAC.
5. **Kantasubrata J.** 2014. Materi Pelatihan Estimasi Ketidakpastian Pengukuran Laboratorium Kimia. BSN. Jakarta
6. **Traple MAL, Saviano AM, Francisco FL, Lourenco FRL.** 2013. *Review Paper : Measurement Uncertainty in Pharmaceutical Analysis and Its Application.* Journal of Pharmaceutical Analysis 4 (1) : 1-5.