

VALIDASI METODE UJI POTENSI ANTIBIOTIK SPEKTINOMISIN SERBUK DENGAN KUMAN UJI *ESCHERICHIA COLI* NIHJ

*Novida Ariyani, Maria Fatima Palupi, Nurhidayah, Indriyana, Anna Miftahul Jannah

Unit Uji Farmasetik dan Premiks
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340

*email: novida_07@yahoo.co.id

ABSTRAK

Validasi metoda merupakan pembuktian bahwa suatu metoda yang dikembangkan menghasilkan hasil uji yang valid. Sebagai laboratorium pengujian, maka Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) selalu berpedoman pada ISO/IEC 17025:2017. Salah satu klausul dalam ISO/IEC 17025:2017 adalah tentang validasi metoda. Tujuan dari studi ini adalah melakukan validasi terhadap metoda uji potensi antibiotik spektinomisin dengan menggunakan *Escherichia coli* NIHJ yang dikembangkan oleh Unit Uji Farmasetik dan Premiks, BBPMSOH. Metode yang dilakukan adalah pengujian potensi dengan menggunakan uji hayati, adapun kuman uji yang digunakan adalah menggunakan kuman uji *E. coli* NIHJ. Parameter validasi yang digunakan adalah presisi, akurasi, linearitas, *limit of detection* (LOD)/batas deteksi, *limit of quantification* (LOQ)/batas kuantitasi dan spesifisitas. Hasil pengujian menunjukkan nilai presisi yang baik dengan nilai *coefficient of variance* (CV) uji adalah 0,53%, nilai akurasi yang baik yaitu 99,90%, nilai linearitas (R^2) 0,994, nilai LOD 1,134 µg/ml, nilai LOQ 1,524 µg/ml, dan spesifisitas yang baik yaitu dengan nilai CV 0,328%. Berdasarkan hasil validasi tersebut maka metode potensi dengan menggunakan kuman uji *E. coli* NIHJ menunjukkan hasil unjuk kerja yang baik dan dapat digunakan untuk analisa rutin uji potensi antibiotik spektinomisin di laboratorium.

Kata kunci: *Escherichia coli*, spektinomisin, potensi, validasi.

ABSTRACT

Method validation is proof that a method developed produces valid test results. As a testing laboratory, National Veterinary Drug Assay Laboratory (NVDAL) follows ISO/IEC 17025:2017. One of the clauses in ISO/IEC 17025:2017 is about method validation. The purpose of this study was to validate the potency test method for spectinomycin using Escherichia coli NIHJ which was developed by the Laboratory Pharmaceutical and Premix, NVDAL. The validation parameters used are precision, accuracy, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and specificity. The test results exhibited a good precision value with a coefficient of variance (CV) value 0.53%, a good accuracy value of 99.90%, a linearity value (R^2) was 0.994, LOD value 1.134 µg/ml, LOQ value 1.524 µg/ml, and good specificity with CV value 0.328%. Based on the validation results, the potency method test using the E. coli NIHJ showed good performance results and could be used for routine analysis of the potency test of spectinomycin antibiotics in the laboratory

Keywords: *Escherichia coli*, spectinomycin, potency, validation

PENDAHULUAN

Spektinomisin merupakan antibiotik aminosiklitol yang dihasilkan dari mikroorganisme *Streptomyces spectabilis* dan mempunyai struktur kimia yang sama seperti golongan aminoglikosida (Toncho dkk, 2015). Spektinomisin merupakan antibiotik bakterisidal ini memiliki aktivitas spektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif (misalnya *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*), anaerob fakultatif (misalnya *Actinomyces bovis*), dan spesies yang berbeda dari *Mycoplasma* (Elkomy dan Aboubakr, 2020; Khan dkk, 2022). Antibiotik ini dapat digunakan baik sebagai zat aktif tunggal maupun kombinasi, umumnya dengan linkomisin, pada unggas untuk pengobatan *airsacculitis* yang disebabkan oleh *Mycoplasma sinoviae* ataupun *Mycoplasma gallisepticum* dan penyakit pernafasan yang kronis serta kompleks yang disebabkan oleh *E. coli* dan *M. gallisepticum* (Elkomy dan Aboubakr, 2020).

Sesuai dengan Peraturan Menteri Pertanian RI Nomor 43 tahun 2020, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) mempunyai tupoksi melakukan pengujian dan pengembangan metode pengujian mutu obat hewan. Guna memperoleh hasil pengujian mutu obat hewan yang valid, maka dilakukan validasi terhadap metode uji yang telah dikembangkan oleh BBPMSOH. Menurut SNI ISO IEC 17025: 2017, validasi metode adalah konfirmasi melalui pengujian dan penyediaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud terpenuhi (Farida, DN dkk., 2018). Tujuan utama validasi metode yaitu untuk menghasilkan hasil analisis yang paling baik (Rohman, 2009). Menurut Harmita (2004), validasi metode pengujian adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium,

untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan penggunaannya. Parameter validasi metode adalah presisi (keseksamaan), akurasi (kecermatan/ketepatan), selektifitas (spesifitas), *limit of detection* (LOD/batas deteksi), *limit of quantification* (LOQ)/batas kuantitas). linearitas, rentang, kekuatan/ketegaran (*robustness*) (Farida, DN dkk., 2018; Harmita, 2004; Kemenkes, 2020). Kriteria penerimaan untuk masing-masing parameter dikatakan baik yaitu untuk presisi apabila nilai CV kurang dari 2 %, akurasi/nilai perolehan kembali yaitu berada antara 90-107%, nilai linearitas (R^2) $\geq 0,99\%$ (Harmita, 2004; Kemenkes, 2020). Parameter yang digunakan dalam validasi metode dipilih sesuai dengan jenis dan metode pengujian yang akan divalidasi.

BBPMSOH dalam melakukan pengujian potensi antibiotik spektinomisin serbuk menggunakan referensi metode yaitu Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) jilid II edisi 4 tahun 2009 dengan menggunakan kuman standar *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031. Dalam rangka pengembangan metode, Unit Uji Farmasetik dan Premiks, BBPMSOH, mengembangkan metode pengujian potensi antibiotik spektinomsin sediaan serbuk menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ. Penggunaan bakteri standar *E. coli* dalam pengujian ini karena bakteri ini lebih aman dibandingkan dengan *Klebsiella pneumoniae*. Hal ini karena *E. coli* termasuk dalam mikroorganisme kelompok risiko 1 (University of South Carolina, 2023; WHO, 2004) sedangkan untuk *Klebsiella pneumoniae* termasuk dalam kategori kelompok risiko 2 (FDA, 2023). Guna mengetahui bahwa metode yang dikembangkan memiliki unjuk kerja yang baik dan hasil valid maka dilakukan validasi metode.

MATERI DAN METODE

Materi dan Alat

Bahan yang digunakan standar spektinomisin (Sigma lot 35H0106), bahan baku spektinomisin HCl 81,82% (no. bets 3232105029C dan kadaluarsa tahun 2024), arsip sampel yang tiap gramnya mengandung spektinomisin 444,67 mg dan linkomisin 222 mg (kadaluarsa tanggal 20/11/2026), *E. coli* NIHJ, *K. pneumonia* ATCC 10031, *monopotassium phosphat* (KH_2PO_4 , Merck Germany.), *potassium hydroxide* (KOH, Merck- Germany), *Distillated water* (DW), pepton (Difco-France), *beef extract* (Difco-France), *yeast extract* (Difco-France), *D(+)* *glucose* (Merck-Germany), dan agar (Bacto-France).

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik (Shimadzu-Jepang), inkubator (Hirasawa, Jepang), kompor listrik, *vortex mixer*, erlenmeyer, botol duran 1000 ml, kertas timbang, tabung, otoklaf (Tomy, Jepang), cawan petri, *waterbath* (Memerth), pipet serologis (pyrex, Jepang), *magnetic stirrer*, pH meter (Metrohm), silinder cup, dan caliper (Mitutoyo).

Metode

Pembuatan buffer 4

Sebanyak 13,3 g KH_2PO_4 dan 6,2 g KOH ditimbang dan dimasukkan dalam *beaker glass*, kemudian dilarutkan dengan 1000 ml DW, dan diaduk perlahan hingga homogen. Kemudian pH disesuaikan menjadi $8,0 \pm 0,1$ dengan NaOH 1 N atau H_2PO_4 1 N. Setelah pH sesuai, masukkan larutan buffer 4 dalam botol duran dan disterilkan dalam otoklaf 121°C selama 15 menit.

Pembuatan medium 8

Pepton, *beef extract*, *yeast extract*, dan *D(+)* glukosa ditimbang masing-masing sebanyak 6 g, 1,5 g, 3 g, dan 1 g, kemudian dimasukkan dalam *beaker glass* dan dilarutkan dengan 1000 ml DW, selanjutnya diaduk

hingga homogen. Kemudian pH disesuaikan menjadi $8,0 \pm 0,1$ dengan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Setelah pH sesuai, larutan dimasukkan ke dalam botol duran yang telah berisi agar 15 g, kemudian direbus sampai agar larut, dan disterilkan dalam otoklaf 121°C selama 15 menit.

Persiapan standar uji potensi dan deret standar

Standar spektinomisin ditimbang minimal 10 mg kemudian dilarutkan dengan buffer 4 hingga diperoleh stok standar dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian dari larutan stok standar dilakukan pengenceran dengan buffer no 4 hingga diperoleh standar konsentrasi tinggi (SH) 200 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi rendah (SL) 50 $\mu\text{g/ml}$. Dibuat deret standar, dimana larutan stok standar 1000 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan dengan buffer no 4 hingga diperoleh larutan standar 400 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$.

Persiapan sampel uji

Bahan baku spektinomisin ditimbang 1 g, kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan buffer 4 hingga diperoleh sampel konsentrasi tinggi (UH) 200 $\mu\text{g/ml}$ dan sampel konsentrasi rendah (UL) 50 $\mu\text{g/ml}$. Arsip sampel ditimbang, kemudian dilarutkan dan encerkan dengan buffer 4 hingga diperoleh sampel konsentrasi tinggi (UH) 200 $\mu\text{g/ml}$ dan sampel konsentrasi rendah (UL) 50 $\mu\text{g/ml}$.

Tahap Pengujian

Uji Potensi antibiotik

Cawan petri diisi dengan media biakan yang terdiri dari dua bagian yaitu lapisan dasar (*base layer*) yang hanya terdiri dari medium biakan saja yaitu media no. 8 dan lapisan atas (*seed layer*) yang terdiri dari medium biakan dengan campuran kuman uji. Lapisan atas dibuat dengan menambahkan 0,2 ml suspensi biakan *E. coli* NIHJ ke dalam 50 ml media no. 8.

Untuk satu kali pengujian potensi diperlukan 5 cawan petri, masing-masing diisi dengan lapisan dasar yaitu media no 8 sebanyak 18 ml dan didiamkan hingga padat. Kemudian dimasukkan lapisan atas sebanyak 4 ml dan didiamkan hingga lapisan tersebut padat. Setelah media siap, kemudian diletakkan empat buah silinder di atas lapisan media pada cawan petri sehingga jarak antara silinder tidak kurang dari 28 mm dengan letak berseberangan seperti membentuk bidang bujur sangkar. Kemudian diteteskan sebanyak 280 µl larutan standar dan larutan sampel sediaan ke dalam silinder pada cawan petri dengan menggunakan *micropipette* secara berurutan sebagai berikut: silinder pertama diisi dengan larutan standar kadar tinggi (SH), silinder kedua diisi dengan larutan sampel sediaan kadar tinggi (UH), silinder ketiga diisi dengan larutan standar kadar rendah (SL), dan silinder keempat diisi dengan larutan sampel sediaan kadar rendah (UL). Inkubasi pada suhu $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 10-18 jam. Potensi antibiotik dihitung dengan mengukur zona hambat yang terbentuk.

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

Keterangan:

- P = potensi (dalam %)
- SH = diameter daerah hambatan yang ditimbulkan standar kadar tinggi
- UH = diameter daerah hambatan yang ditimbulkan sediaan kadar tinggi
- SL = diameter daerah hambatan yang ditimbulkan standar kadar rendah
- UL = diameter daerah hambatan yang ditimbulkan sediaan kadar rendah

Uji Presisi

Penetapan presisi metode dilakukan dengan dua cara yaitu dengan pengulangan pengujian dengan menghitung nilai CV

menggunakan bahan baku spektinomisin HCl dan membandingkan uji yang dikembangkan dengan uji standar dalam FOHI Jilid II Edisi 4 Tahun 2009. Penetapan presisi berdasarkan nilai CV dilakukan dengan melakukan pengujian potensi sampel bahan baku spektinomisin HCl serbuk dengan kandungan spektinomisin 818,2 g/kg sebanyak 12 kali dengan menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ. Nilai presisi ditentukan dengan menghitung nilai CV dari nilai potensi antibiotik yang diperoleh. Nilai keberterimaan CV untuk presisi yang baik pada pengujian ini adalah kurang dari 2%.

Penetapan presisi selanjutnya dilakukan dengan pengujian potensi arsip sampel dengan kandungan campuran spektinomisin base 66,7 g/150 g dan linkomisin 33,3 g/150 g dengan menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ dan dengan menggunakan bakteri standar *K. pneumonia* ATCC 10031 sesuai FOHI Edisi 4 Jilid 2 Tahun 2009. Tiap pengujian dilakukan sebanyak 12 kali. Hasil uji kedua metode kemudian dibandingkan dengan menggunakan uji t. Metode uji potensi dengan bakteri standar *E. coli* NIHJ dinyatakan presisi apabila berdasarkan hasil uji t ($\sigma=0,05$), tidak berbeda dengan hasil uji menggunakan bakteri standar *K. pneumonia* ATCC 10031 sesuai FOHI Edisi 4 Jilid 2 Tahun 2009.

Uji Akurasi

Akurasi metoda dihitung dengan melakukan penetapan kadar standar spektinomisin untuk menemukan perolehan kembali terhadap nilai kadar standar sebenarnya. Uji ini dilakukan dengan menghitung nilai perolehan kembali (*recovery*) dengan uji potensi terhadap *working standard*. Pengujian terhadap standar dilakukan sebanyak 6 kali. Kemudian dihitung rata-rata hasil pengujian potensi *working standard* spektinomisin sebagai prosentase nilai perolehan kembali (nilai akurasi). Kriteria penerimaan akurasi/nilai perolehan kembali

yaitu berada antara 90 – 107 %.

Uji Linearitas

Linearitas metoda diuji dengan melakukan prosedur uji potensi antibiotik terhadap standar spektinomisin dengan 5 konsentrasi yaitu masing-masing 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml dan 25 µg/ml. Pada validasi metode ini, pengujian nilai linearitas dilakukan tiga kali pengulangan dan diambil rata-ratanya pada tiap konsentrasi dan kemudian dihitung linearitasnya. Data yang diperoleh kemudian dihitung secara statistika dengan menentukan nilai koefisien korelasi (R^2), intersep (a) dan slope (b). Suatu metode dinyatakan baik jika memiliki linearitas $\geq 0,99$ (Kemenkes, 2020).

Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ)

Perhitungan nilai LOD dan LOQ dilakukan dengan menggunakan konsentrasi terkecil dari deret linearitas yang digunakan yaitu 25 µg/ml sebanyak enam kali. Rumus yang digunakan untuk menghitung LOD dari satu/ beberapa titik konsentrasi sebagai berikut:

$$((SD (y-y_1)^2 \times 3) / slope$$

Nilai LOQ didapat dengan menggunakan rumus:

$$((SD (y-y_1)^2 \times 10) / slope$$

Spesifisitas

Parameter spesifisitas metode uji potensi dengan menggunakan bakteri *E. coli* NIHJ dilakukan untuk membuktikan bahwa adanya zat lain dalam sediaan tidak akan mengganggu hasil uji potensi spektinomisin. Sampel yang digunakan adalah sampel yang tiap gramnya mengandung spektinomisin 444,67 mg dan linkomisin 222 mg. Parameter yang dievaluasi adalah perbandingan diameter yang didapatkan dari spektinomisin sediaan dan standar dengan konsentrasi tinggi (200 µg/ml) dan konsentrasi rendah (50 µg/ml) sebagaimana uji potensi spektinomisin. Metode dinyatakan spesifik apabila dengan uji t ($\sigma=0,05$), tidak ada

perbedaan diameter standar dan sampel pada konsentrasi yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi metode pengujian potensi antibiotik spektinomisin serbuk dengan menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ yang dilakukan mencakup parameter presisi, akurasi, linearitas, nilai LOD dan LOQ, dan spesifitas. Hasil validasi metode tersebut adalah sebagai berikut:

Presisi

Penetapan presisi metode dilakukan dengan melakukan pengujian potensi sampel bahan baku spektinomisin HCl serbuk dengan kandungan spektinomisin 818,2 g/kg sebanyak 12 kali. Hasil uji potensi dinyatakan dalam % yang merupakan kesesuaian jumlah potensi yang terukur dengan jumlah kadar spektinomisin dalam sampel. Nilai CV dari pengulangan sampel spektinomisin yaitu 0,53%, nilai ini lebih kecil dari persyaratan yaitu 2 % (Harmita, 2004), sehingga metode uji ini memiliki presisi yang baik. Hasil pengujian presisi dengan pengulangan pengujian tersaji dalam Tabel 1

Penetapan nilai presisi juga dilakukan dengan membandingkan hasil pengujian potensi dengan menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ dan *K. pneumonia* ATCC 10031 (FOHI jilid II edisi 4 tahun 2009). Hasil uji potensi tersaji dalam Tabel 2.

Hasil uji kedua metode ini dibandingkan dengan menggunakan uji t untuk mengetahui nilai presisi. Berdasarkan hasil uji t saling bebas didapatkan bahwa pengujian dengan menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ tidak berbeda nyata dengan uji menggunakan referensi FOHI Edisi 4 Jilid 2 Tahun 2009 yaitu dengan bakteri standar *K. pneumoniae* ATCC 10031 ($\sigma=0,05$: -0,3019; SD 0,4469; t hitung 0,4016; derajat bebas: 22). Sehingga, dapat dinyatakan bahwa metode uji potensi spektinomisin dengan bakteri standar *E. coli* NIHJ memiliki presisi yang baik.

Tabel 1 Hasil Uji potensi spektinomisin serbuk

Pengulangan	Potensi (%) terhadap kesesuaian zat aktif dalam bahan baku
1	99,66
2	99,58
3	99,26
4	100,93
5	100,05
6	99,90
7	99,57
8	99,97
9	100,09
10	99,11
11	99,37
12	99,45
Rata-rata	99,78
Standar Deviasi (SD)	0,53
CV (%)	0,53

Tabel 2. Hasil uji potensi spektinomisin serbuk dengan bakteri standar *E. coli* NIHJ dan *K. pneumoniae* ATCC 10031

Pengulangan ke:	Hasil Uji Potensi (%)	
	Bakteri standar <i>E. coli</i> NIHJ	Bakteri standar <i>pneumoniae</i> ATCC 10031
1	100,19	98,39
2	99,84	99,54
3	99,35	99,91
4	98,99	99,89
5	100,34	99,28
6	99,63	99,67
7	99,88	100,16
8	99,44	99,78
9	99,61	99,67
10	100,12	99,20
11	99,58	99,93
12	99,19	99,87
Rata-rata	99,68	99,61
SD	0,41	0,47
CV (%)	0,41	0,47

Akurasi

Akurasi dihitung dengan melakukan penetapan kadar *working standard* untuk menemukan perolehan kembali terhadap nilai kadar standar sebenarnya. Hasil uji akurasi disajikan dalam Tabel 3 dibawah ini

Berdasarkan data dalam Tabel 3 diketahui bahwa nilai perolehan kembali adalah 99,90 %. Nilai ini berada dalam kriteria penerimaan kembali untuk nilai akurasi yaitu 90–107 % (Harmita, 2004). Hasil ini menunjukkan bahwa metode uji ini memiliki nilai akurasi yang baik.

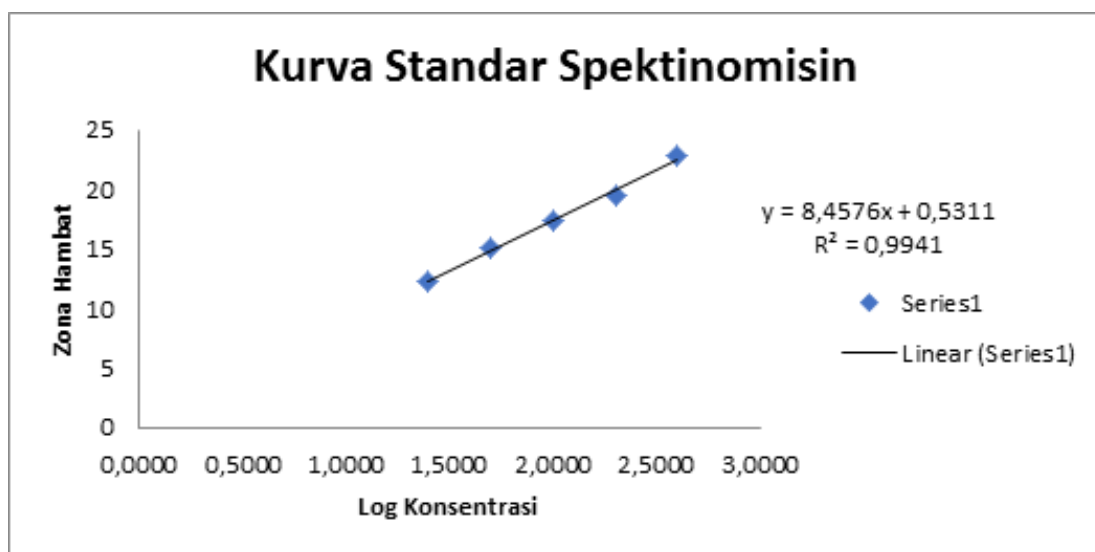
Linearitas

Uji linearitas terhadap standar spektinomisin

pada metode ini menggunakan 5 titik konsentrasi yang berbeda (400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml dan 25 µg/ml) sehingga didapatkan kurva standar (Gambar.1). Pada validasi metode ini, pengujian nilai linearitas dilakukan tiga kali pengulangan dan diambil rata-ratanya pada tiap konsentrasi dan kemudian dihitung linearitasnya. Hasil uji zona hambat kurva standar tersaji pada Tabel 4. Berdasarkan data dari Tabel 4 didapatkan linearitas (R^2) kurva standar spektinomisin adalah 0,994. Metode dinyatakan baik jika memiliki linearitas $\geq 0,99$, hal ini menunjukkan bahwa linearitas pada metode ini memenuhi syarat penerimaan linearitas.

Tabel 3 Hasil perolehan kembali standar spektinomisin

Pengulangan ke:	Perolehan Kembali Kadar Standar Spektinomisin (%)
1	100,07
2	99,86
3	99,97
4	100,50
5	99,14
6	99,88
Rata-rata perolehan kembali	99,90
SD	0,44
CV (%)	0,44



Gambar 1. Kurva linearitas standar spektinomisin

Tabel 4 Hasil zone hambat kurva standar spektinomisin

Cawan petri	Diameter Zone Hambat (mm)						
	Rp (1) (µg/mL)	C1 (µg/mL)	C2 (µg/mL)	C3 (µg/mL)	Rp (2) (µg/mL)	C4 (µg/mL)	C5 (µg/mL)
	50	400	200	100	50	50	25
1	15,03	22,96	19,37	17,66	15,18	15,00	12,35
2	15,77	22,94	19,29	17,16	15,05	15,05	12,02
3	15,02	22,95	20,17	17,50	15,06	15,06	12,39
Rata-rata	15,27	22,95	19,61	17,44	15,10	15,04	12,25
Rata-rata koreksi	-0,02	22,87	19,53	17,36	+0,09	15,13	12,34
Rata-rata Rp	15,19						

Tabel 5 Hasil log konsentrasi kurva standar dan zone hambat terkoreksi

Log Konsentrasi (µg/ml)	2,6020	2,3010	2,000	1,6989	1,3979
Zona hambat (rata-rata+koreksi)	22,87	19,53	17,36	15,13	12,34

Tabel 6 Data perhitungan nilai LOD dan LOQ spektinomisin

Konsentrasi (µg/ml)	Log konsentrasi	Zona hambat	y_1	$(y-y_1)^2$
25	1,3979	12,46	12,3500	0,0121
25	1,3979	12,45	12,3500	0,0100
25	1,3979	12,47	12,3500	0,0144
25	1,3979	12,44	12,3500	0,0081
25	1,3979	12,50	12,3500	0,0225
25	1,3979	12,52	12,3500	0,0289
$\Sigma (y-y_1)^2$				0,0960
$\Sigma (y-y_1)^2/(n-2)$				0,0240
Simpangan baku residual [akar $\Sigma (y-y_1)^2/(n-2)$] (SDr)				0,1549
LOD = 3SDr/slope (log)				0,054952 (= 1,134 µg/ml)
LOQ = 10SDr/slope (log)				0,183172 (= 1,524 µg/ml)

Berdasar Tabel 6 diketahui bahwa nilai LOD dan LOQ masing-masing yaitu 1,134 µg/ml dan 1,524 µg/ml. Batas deteksi (LOD) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Rohman, 2009), sedangkan batas kuantifikasi (LOQ) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004).

Spesifisitas

Hasil uji spesifisitas dari metode ini ditampilkan dalam Tabel 7 dibawah ini. Berdasarkan uji t saling bebas ($\sigma=0,05$), didapatkan bahwa diameter pada konsentrasi tinggi maupun rendah untuk spektinomisin yang dihasilkan oleh sampel tidak berbeda dengan standar spektinomisin. Metode dinyatakan spesifik apabila berdasarkan uji t saling bebas, tidak ada perbedaan diameter standar

dan sampel pada konsentrasi yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini memiliki spesifitas yang baik. Parameter spesifitas ini dilakukan untuk membuktikan bahwa adanya zat lain dalam sediaan tidak mengganggu hasil uji potensi spektinomisin.

Pada validasi metode ini, spesifisitas dievaluasi juga berdasarkan hasil uji potensi dari spektinomisin dalam sediaan obat hewan campuran spektinomisin-linkomisin. Pengujian dilakukan sebanyak 6 dan hasil uji potensi dibandingkan dengan kadar kandungan spektinomisin dalam sampel. Spesifisitas hasil

uji potensi dinyatakan baik apabila hasil uji potensi berada dalam rentang 95-105% dari yang dinyatakan di komposisi. Berdasarkan hasil uji pada Tabel 8 dibawah ini menunjukkan bahwa dari keenam hasil uji, potensi spektinomisin berada dalam rentang 95-105%.

Nilai CV pada pengulangan 6 kali menunjukkan CV 0,32828, nilai ini sangat baik yaitu kurang dari 2 % (Harmita, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa adanya zat lain seperti linkomisin maupun pembawa dalam sediaan jadi obat hewan, tidak mempengaruhi spesifisitas metoda uji potensi spektinomisin.

Tabel 7. Diameter Standar dan Sampel Spektinomisin pada sampel Linkomisin-Spektinomisin (mm)

Pengulangan	Konsentrasi tinggi (200 µg/ml)		Konsentrasi rendah (50 µg/ml)	
	Standar	Sampel	Standar	Sampel
1	20,50	20,24	15,55	15,67
2	20,42	20,42	15,78	15,78
3	20,48	20,40	15,55	15,66
4	20,72	20,72	15,43	15,43
5	20,38	20,45	15,84	15,84
6	20,49	20,49	15,43	15,55
7	20,43	20,43	16,06	16,06
8	20,25	20,25	16,47	16,17
9	20,37	20,37	15,84	15,84
10	20,67	20,67	16,24	16,24
Rata-rata	20,47	20,44	15,82	15,82
SD	0,13924	0,15522	0.3510	0.2554

Tabel 8. Hasil Uji Potensi spektinomisin berdasarkan kesesuaian kadar spektinomisin dalam sampel Spektinomisin –Linkomisin

Pengulangan	Hasil uji potensi (%)
1	99,88
2	99,44
3	99,61
4	100,12
5	99,58
6	99,19
Rata-rata	99,637
SD	0,327
CV	0,328

KESIMPULAN

Hasil pengujian validasi potensi spektinomisin serbuk menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ dengan parameter akurasi, presisi, linearitas, serta spesifitas didapatkan nilai yang baik dan memiliki kesesuaian dengan persyaratan. Nilai LOD dan LOQ untuk uji potensi spektinomisin serbuk menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ adalah 1,134 µg/ml dan 1,524 µg/ml. Pengujian potensi dengan menggunakan bakteri standar *E. coli* NIHJ dinyatakan terkonfirmasi unjuk kerjanya dan dapat digunakan untuk analisa rutin di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2009, Farmakope Obat Hewan Indonesia, Jilid II (Farmasetik dan Premiks) Edisi 4, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Jakarta. Halaman 334-335, 501-507.
- Elkomy Adan Aboubakr M, 2020, Bioequivalence study of two oral lincomycin-spectinomycin combination (Linco-Spectin 100® and Righto-Spectin®) in broiler chickens, *W.J. of pharmacy and pharmaceutical science*. Vol 9., 3, 608-619.
- Faridah DN, Erawan D, Sutriah K, Hadi A, dan Budiantari F, 2018, Implementasi SNI ISO/IEC 17025:2017 Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi, Badan Standardisasi Nasional (BSN), Halaman 79-86.
- Food and Drug Administration-Centre of Disease Control [FDA-CDC]. 2023. *Klebsiella pneumoniae*. Terdapat pada <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/0453-klebsiella-pneumoniae.pdf>. Diunduh pada tanggal 01 Agustus 2023.
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. I., No. 3, Desember, Hal: 117-135
- Kemkes. 2020. Farmakope Indonesia Edisi VII. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Khan AE, Ma J, Xiaobin M, Jie Y, Mengyu L, Hong L, Shah L, dan Liu A, 2022, Safety evaluation study of Lincomycin and Spectinomycin Hydrochloride intramuscular injection in chickens, *Toxicology reports*, 9, 204-219.
- Rohman, A. 2009. Kromatografi untuk analisis obat. Edisi Pertama. Graha Ilmu Yogyakarta, 223 – 226
- Toncho D, Beev G, dan Denev S, 2015, Spectinomycin-Present, Future and Alternative. 118-121.
- University of South Carolina [USC]. 2023. *Escherichia coli*. Terdapat pada https://sc.edu/about/offices_and_divisions/ehs/documents/biological_safety/e-coli-strains-nih-guidelines.pdf. Diunduh pada tanggal 1 Agustus 2023
- World Health Organization (WHO), 2004, Laboratory biosafety manual, 3rd ed, Geneva.