

Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Linkomisin menggunakan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Validation of Analysis Method for Determination of Lincomycin Levels in Broiler Chickens using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Alfian Yusak Muzaki¹, Cahyo Wibisono², Ika Nindya Irianti³,
Agustina Dwi Wijayanti⁴, Dyah Ayu Widiasih⁵

¹Program Studi Magister Sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

²Program Studi Magister Sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada ³Program Studi Magister Sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada ⁴Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

⁵Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
*Corresponden author: Email: tinabdy@ugm.ac.id

Naskah diterima: 4 Agustus 2022, direvisi: 4 Juni 2023, disetujui: 6 Juni 2023

Abstract

Antibiotics are drugs that are often used in the treatment of bacterial infections by inhibiting growth or by killing bacteria. One of the drugs often used for bacterial therapy in broiler chickens is lincomycin, a soluble powder antibiotic used to treat infectious diseases such as complex chronic respiratory disease (CRD) and mycoplasmosis. The use of antibiotics in broiler chickens increases the risk of residues due to the remaining drug content, so it is necessary to analyze the levels of lincomycin using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This study aimed to determine the validity of the method of analysis of lincomycin levels in chickens using HPLC brand Shimadzu 6.1, a mobile phase consisting of a mixture of buffer and acetonitrile (89:11) with a flow rate of 1 ml/min, UV Vis detector with a wavelength of 220 nm, and C18 Shim-pack column measures 150 L x 4.6 mm at 350C. The results showed that these values were in accordance with the validation criteria based on linearity, specificity, accuracy, precision, Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) parameters. The method of analyzing lincomycin levels using HPLC has appropriate criteria and can be used to measure lincomycin levels in broiler chickens.

Keywords: HPLC; lincomycin; validation

Abstrak

Antibiotik adalah obat yang sering digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri dengan menghambat pertumbuhan atau dengan membunuh bakteri. Salah satu obat yang sering digunakan untuk terapi bakteri pada ayam broiler adalah lincomycin, yaitu antibiotik bubuk larut yang digunakan untuk mengobati penyakit menular seperti penyakit pernapasan kronis kompleks (CRD) dan mikoplasmosis. Penggunaan antibiotik pada ayam broiler meningkatkan risiko residu karena kadar obat yang tertinggal, sehingga perlu dilakukan metode analisis kadar lincomycin menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui validitas metode analisis kadar linkomisin pada ayam dengan HPLC merk Shimadzu 6.1, fase gerak yang terdiri dari campuran buffer dan asetone nitril (89:11) dengan aliran laju 1 ml/menit, detektor UV Vis dengan panjang gelombang 220 nm, dan kolom C18 Shim-pack berukuran 150 L x 4,6 mm pada 350C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai-nilai tersebut sesuai dengan kriteria validasi berdasarkan linearitas, spesifisitas, akurasi, presisi, parameter *Limit of Detection* (LOD), dan *Limit of Quantification* (LOQ) atau batas kuantifikasi. Kesimpulan yang diperoleh adalah metode analisis kadar lincomycin menggunakan HPLC ini memiliki kriteria yang sesuai dan dapat digunakan untuk mengukur kadar lincomycin pada ayam broiler.

Kata kunci: HPLC; linkomisin; validasi

Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara dengan jumlah penduduk besar dan dikategorikan sebagai negara yang memiliki tingkat konsumsi pangan yang tinggi. Salah satu kebutuhan pangan yang harus terpenuhi adalah protein hewani. Komoditas peternakan khususnya produk perunggasan merupakan pendorong utama penyediaan protein hewani nasional (Etikaningrum dan Iswantoro, 2017). Peternakan unggas mempunyai prospek pasar yang sangat baik dan sangat besar, karena didukung oleh karakteristik produk unggas yang dapat diterima oleh masyarakat Indonesia secara luas, selain itu produk pangan asal unggas memiliki harga yang murah dan mudah diperoleh (Adi *et al.*, 2017). Populasi ayam *broiler* pada tahun 2020, mencapai 2,92 miliar ekor dengan total produksi sebesar 3,21 juta ton daging, pada tahun 2021 jumlah populasi ayam *broiler* di Indonesia meningkat menjadi 3,1 miliar ekor dengan total produksi 3,42 juta ton (Badan Pusat Statistik RI, 2022). Daging Ayam *broiler* sendiri memiliki populasi paling banyak dibanding dengan berbagai populasi ayam lainnya, dengan presentase 80,34% dari total keseluruhan populasi jenis ayam yang ada di Indonesia (Badan Pusat Statistik RI, 2022).

Komoditas protein hewani yang saat ini paling mudah didapatkan adalah daging ayam dan sangat banyak dibutuhkan di Indonesia. Suplai daging ayam di Indonesia terutama berasal dari ayam *broiler*. Tahun 2020 menurut Badan Pusat Statistik Nasional telah meningkat menjadi 12,79 Kg. Peningkatan jumlah konsumsi ayam *broiler* diikuti dengan meningkatnya jumlah penggunaan antibiotik dalam pemeliharaan ayam di peternakan. Penggunaan antibiotik semakin dibatasi dengan dikeluarkannya Peraturan Menteri Pertanian nomor 14 tahun 2017 tentang pelarangan penggunaan antibiotik sebagai *Antibiotic Growth Promotor* (AGP) dan Peraturan Menteri Pertanian nomor 22 tahun 2017 tentang pelarangan pakan yang dicampur antibiotik selain untuk kebutuhan terapi infeksi mikroba, maka penggunaan antibiotik semakin dibatasi untuk menghindari resistensi antibiotik (Yuningsih, 2009; Kementerian Pertanian, 2017).

Masalah utama dalam penggunaan antibiotik adalah dosis yang tidak tepat

sehingga dapat menyebabkan residu antibiotik dan resistensi. Residu antibiotik merupakan analit atau metabolit yang disisakan dari metabolisme obat yang terdapat dalam jaringan, hati, maupun plasma, yang diakibatkan adanya sisa kadar obat dalam jaringan tersebut. Kehadiran residu antibiotik dalam pangan hewan khususnya pada ayam berhubungan dengan beberapa efek pada kesehatan manusia yaitu hipersensitifitas, gangguan gastrointestinal, kerusakan jaringan, dan kekacauan neurologikal, hingga mengalami resiko resistensi terhadap beberapa mikroorganisme patogen yang akan menimbulkan masalah besar dalam bidang kesehatan manusia maupun hewan (Mahmoudi dkk., 2014).

Penggunaan antibiotik yang lainnya pada peternakan ayam *broiler* adalah sebagai imbuhan pakan (*feed additive*) untuk memacu pertumbuhan (*growth promoter*), meningkatkan bobot karkas dan produksi, serta meningkatkan efisiensi penggunaan pakan (Choirunnisa *et al.*, 2019), namun utamanya penggunaan antibiotik sebagai pengobatan infeksi mikroba. Salah satu antibiotik yang digunakan pada ayam *broiler* adalah linkomisin. Linkomisin merupakan antibiotik yang digunakan pada peternakan ayam *broiler* untuk mencegah atau mengobati penyakit akibat infeksi bakteri, biasanya penggunaannya dicampurkan dengan air minum (E. Riviere dan Papich, 2018). Linkomisin bersifat bakteriostat, spektrum linkomisin yaitu dengan menghambat sintesis protein dalam sel mikroba dengan mengikat subunit ribosom 50S dengan mekanisme mirip dengan golongan makrolida dan sangat efektif terutama terhadap *Mycoplasma sp.* dan bakteri Gram negatif seperti *Actinobacillus sp.*, *E. coli*, *Campylobacter sp.*, *Erysipelotrix sp.*, *Pasteurella sp.* dan *Salmonella sp.* (Wang dkk., 2020).

Anastasia (2011) menjelaskan bahwa metode analisis kadar obat menggunakan *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode analisis kadar obat yang banyak dikembangkan. Analisis kadar obat menggunakan HPLC merupakan suatu metode kimia dan fisiko-kimia yang menggunakan teknologi kolom sistem pompa tekanan tinggi dan detektor yang sensitif sehingga dapat memisahkan senyawa kimia organik yang tidak

mudah menguap dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi (Anastasia, 2011; Stenersen, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis kadar linkomisin dengan menggunakan alat HPLC sebagai salah satu langkah mendeteksi kadar linkomisin pada ayam broiler. Validasi metode analisis adalah satu penilaian pada salah satu parameter tertentu berdasarkan percobaan secara berkala yang dilakukan di laboratorium untuk menunjukkan bahwa parameter tersebut layak pada penggunaannya (Harmita, 2020). Parameter dalam melakukan validasi metode analisis adalah linearitas, spesifisitas, presisi, akurasi, *limit of detection* (batas deteksi), dan *limit of quantification* (batas kuantifikasi) (Sugihartini, dkk., 2014). Penelitian ini diharapkan memberikan informasi yang akurat mengenai metode analisis kadar linkomisin pada ayam broiler menggunakan HPLC yang dapat dijadikan salah satu acuan penelitian mendatang.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kromatografi cair kinerja tinggi merek Shimadzu 6.1. Sistem kontrol yang digunakan adalah SCL-10 A VP, *degasser* DGU-14A, oven CTO-10 AC VP, dan kolom merek Cliepus C₁₈ spesifikasi 4,6 x 150 mm. neraca elektrik (Ohaus), Lincomycin Hydrochloride (Sigma Aldrich), sentrifus (Hettich, Jerman), *vortex mixer* (Barnstead), mikropipet (Socorex, Acura 825, Swiss), pH meter, tabung penyimpanan sampel (Eppendorf), gelas ukur, labu ukur, gelas beker (Pyrex dan Iwaki), asetonitril (pro HPLC, JT. Backer), *aquabidest* (Ikapharmindo Putramas, Jakarta), *hexanesulfonic acid sodium salt* (Sigma Aldrich), natriumhidroksida/NaOH, asam fosfat (pro analisis, Merck, Germany), Natrium Hidroksida, dan peralatan pendukung lainnya. Metode yang digunakan dalam penelitian ini merupakan pengembangan metode Abualhasan dkk. (2012). Tahapan dalam penelitian ini adalah pembuatan larutan standar (*stock solution*), pembuatan bufer untuk fase gerak, preparasi

sampel yang meliputi pembuatan larutan standar dan pengenceran, injeksi sampel, dan analisis hasil.

Pembuatan buffer dilakukan dengan melarutkan asam fosfat sebanyak 13,5 gram dan *hexanesulfonic acid sodium salt* sebanyak 600 mg yang kemudian dihomogenkan di dalam 800 ml aquabides. PH larutan ditetapkan dalam kisaran 6-6,1 dengan ammonium hidroklorid, selanjutnya ditambah aquabides hingga 1000 mL.

Fase gerak dibuat dengan mencampurkan larutan buffer (89:11) sebanyak 89 ml dan asetonitril sebanyak 11 ml di dalam botol fase gerak. Fase gerak yang sudah dibuat dan tercampur secara homogen dimasukkan selanjutnya dimasukkan ke dalam *ultrasonic bath* yang telah terisi *aquades* dengan suhu 30 °C selama 15 menit.

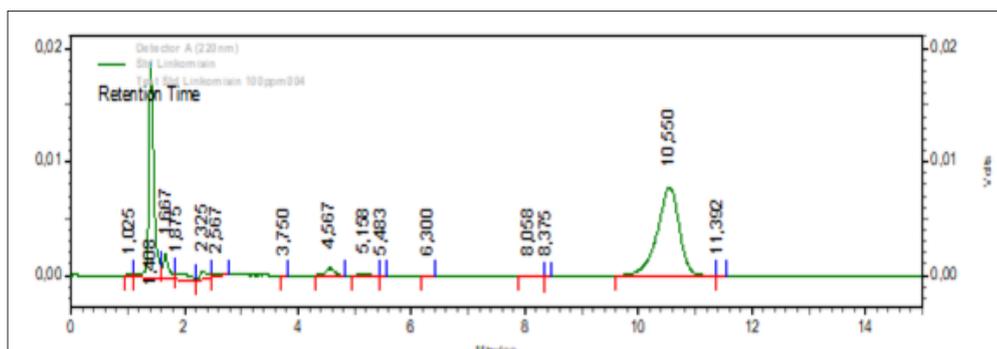
Larutan standar dibuat dengan melarutkan 10 mg linkomisin murni dengan fase gerak sampai 100 ml. Pengenceran larutan standar dilakukan dengan menggunakan pelarut fase gerak yang dibuat dari buffer dan asetonitril. Konsentrasi pengenceran bertingkat yang digunakan adalah konsentrasi 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml yang selanjutnya diinjeksikan sebanyak 20 µl ke HPLC dengan pengaturan dan kondisi HPLC yang mengacu metode Abualhasan dkk. (2012) yang terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi dan Pengaturan pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC)

Kondisi	Pengaturan
Kecepatan Air	1 mL/ menit
Panjang gelombang	220 nm
Fase stasioner/Kolom	Shim-pack ODS C 18, 150 x4,6mm
Suhu kolom	35°C
Volume injeksi	20µl
Waktu running	15 menit

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian ini adalah analisis linkomisin pada berbagai konsentrasi yang telah ditentukan dan bentuk kromatogram dari alat HPLC disajikan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa puncak area linkomisin muncul pada menit ke 10. Validasi metode dilakukan dengan beberapa parameter yaitu linearitas, spesifisitas, akurasi, presisi, Limit of Detection (LOD) atau



Gambar 1. Hasil kromatogram linkomisin

batas deteksi, dan Limit of Quantification (LOQ) atau batas kuantifikasi.

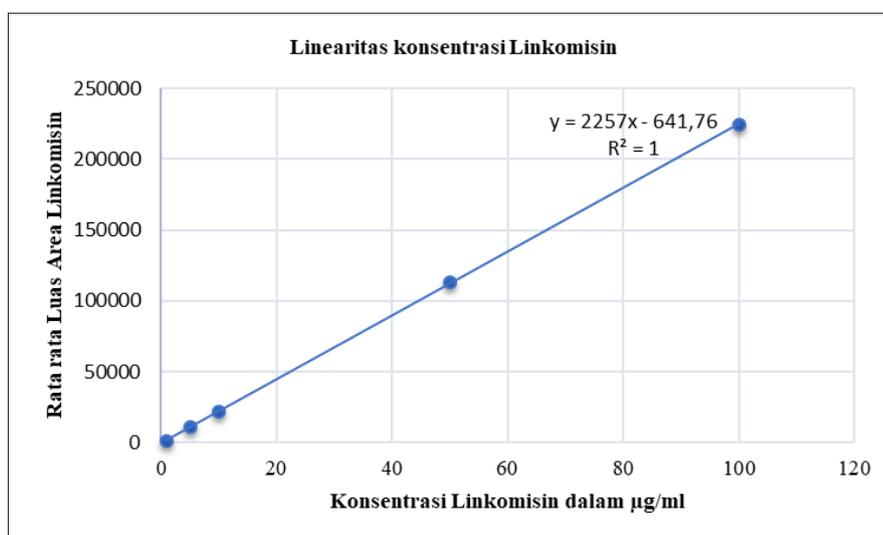
Linearitas

Linearitas merupakan salah satu metode uji yang digunakan untuk menghasilkan suatu hasil uji yang proporsional terhadap kepekatan analit sampel dalam jangkauan kepekatan yang ada (Harmita, 2020). Linearitas ditetapkan dengan metode regresi kuadrat kecil yang sebelumnya dilakukan tiga kali pengulangan pada setiap konsentrasi (Anastasia, 2011). Pengukuran linearitas dilakukan dengan membuat pengenceran bertingkat sebanyak lima konsentrasi. Berdasarkan hasil pengujian linearitas diperoleh suatu persamaan linear $y = 2257x - 641,76$ dengan nilai $r = 1$ yang disajikan pada Gambar 2. Menurut Harmita (2020), syarat linearitas yang baik yaitu nilai koefisien korelasi (r) $\geq 0,9990$. Hasil analisis linearitas pada penelitian ini menunjukkan bahwa nilai $r = 1$ sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan antara luas area puncak dengan konsentrasi

adalah linear karna memenuhi syarat nilai r yang baik. Linearitas ini menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan ini memenuhi persyaratan yaitu kriteria linearitas yang baik.

Akurasi

Akurasi merupakan parameter pengukuran yang ditunjukkan dengan seberapa dekat hasil analisis dengan analit yang sebenarnya dan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali analit yang ditambahkan. (Harmita, 2020). Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan minimal tiga level konsentrasi dengan tiga replikasi untuk setiap level konsentrasi (Rohman, 2009). Berdasarkan hasil perhitungan yang tertera pada Tabel 2, nilai perolehan kembali berkisar antara 26,54% hingga 99,86%. Nilai tersebut bervariasi karena dipengaruhi oleh konsentrasi sampel linkomisin yang digunakan. Syarat akurasi yang baik adalah 98-102% (Harmita, 2020). Menurut FDA (2001) juga menyatakan bahwa nilai akurasi yang baik yaitu 80-120%. Berdasarkan data tersebut, dapat disimpulkan



Gambar 2. Grafik linearitas linkomisin 5 konsentrasi

bahwa data yang memenuhi kriteria parameter akurasi baik terdapat pada data linkomisin dengan konsentrasi 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL dan 1 µg/mL. Konsentrasi 1 µg/mL memiliki akurasi yang tidak memenuhi standar pada dapat disebabkan metode yang digunakan tidak dapat mengukur kadar sampel dengan konsentrasi yang kecil (Guo dkk., 2021).

Tabel 2. Hasil Penghitungan Akurasi

Konsentrasi µg/ml	Perolehan kembali (%)
100 µg/ml	99,19
50 µg/ml	99,86
10 µg/ml	93,52
5 µg/ml	88,35
1 µg/ml	26,54

Spesifisitas

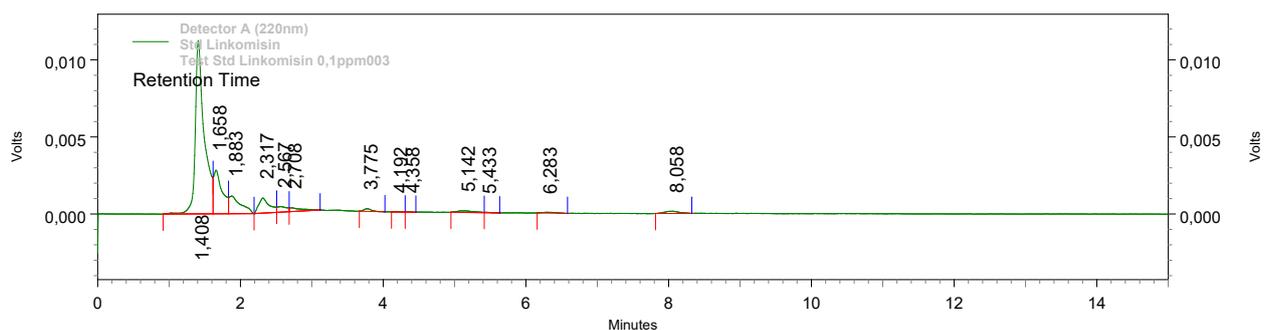
Spesifisitas suatu metode analisis dengan kemampuan mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti adanya pengganggu, prekursor sintetik, produk degradasi, dan komponen matriks. Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan dua jalan, yang pertama adalah optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa – senyawa lain. Metode kedua adalah dengan menggunakan detektor

selektif (Rohman, 2009). Hasil kromatogram blangko saja dan linkomisin yang diencerkan dengan fase gerak ditunjukkan pada Gambar 2 dan Gambar 3.

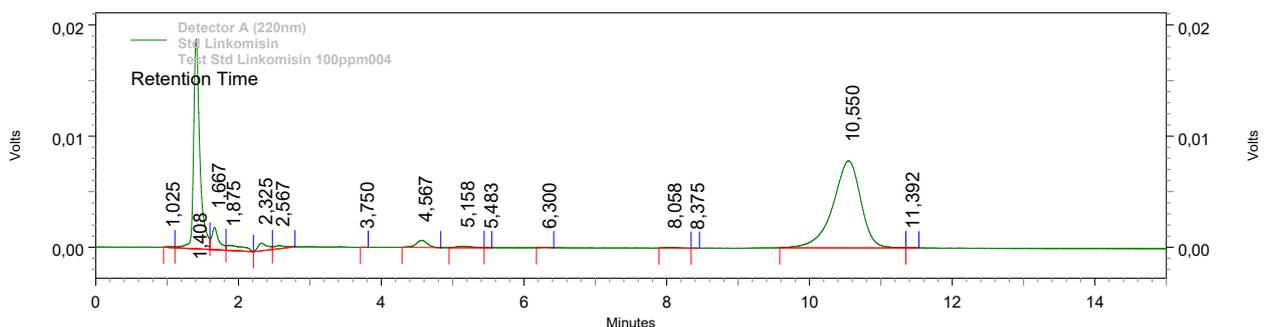
Berdasarkan hasil kromatogram Gambar 1 tidak menunjukkan area puncak dengan waktu retensi antara menit ke-10 hingga menit ke-10,5, pada Gambar 2 menunjukkan kemunculan area puncak pada menit ke 10,5. Luas area puncak yang terbentuk pada setiap konsentrasi linkomisin. Semakin tinggi konsentrasi linkomisin yang diinjeksikan maka semakin besar luas area puncak yang terbentuk. Hasil kromatogram yang terbentuk menunjukkan spesifisitas yang baik karena dapat membedakan senyawa linkomisin tepat dan akurat pada waktu retensi tertentu dengan tidak terdeteksi kemunculan senyawa pengganggu pada area puncak tersebut.

Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata – rata jika metode diterapkan secara berulang pada sampel – sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Konsep presisi diukur dengan simpangan baku. Presisi dapat



Gambar 2. Hasil kromatogram blangko



Gambar 3. Hasil kromatogram linkomisin konsentrasi 100µg/ mL

dibagi tiga kategori yaitu keterulangan, presisi antara, dan ketertiruan. Keterulangan dapat diukur dengan pengulangan minimal 6 kali dengan konsentrasi analit 100%, atau dapat juga dilakukan dengan pengulangan minimal 9 kali, yaitu 3 konsentrasi dengan 3 kali pengulangan. Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2020).

Tabel 3. Data perhitungan hasil kromatogram sampel yang ditambahkan linkomisin dengan lima konsentrasi bertingkat.

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	RSD (%)
100	6381,87	2,31
50	2725,58	1,97
10	748,645	2,90
5	317,757	2,60
1	239,953	32,71

Kriteria presisi diberikan jika metode menunjukkan nilai *relative standart deviation* (RSD) atau koefisien variasi sebesar 2% atau kurang (Prcetic dkk., 2011; Wang, 2020). Nilai RSD yang disajikan Tabel 3 menunjukkan nilai $\leq 2\%$ hanya konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan konsentrasi lainnya tidak memenuhi syarat presisi.. Berdasarkan hasil perhitungan Tabel 3 menunjukkan bahwa metode analisis memiliki nilai presisi yang kurang baik karena kurang mendeteksi linkomisin dengan nilai luas area yang tetap pada konsentrasi tertentu.

Limit of Detection (LOD) atau Batas deteksi

Batas deteksi dilakukan untuk mengetahui analit dengan konsentrasi terkecil dalam sampel pada pengenceran bertingkat (Kumar dan Rajevkumar, 2017). Batas deteksi linkomisin berdasarkan perhitungan rumus batas deteksi adalah 4,19 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil tersebut maka 4,19 $\mu\text{g/mL}$ adalah konsentrasi minimal yang mampu dideteksi oleh metode HPLC. Penelitian Abualhasan dkk. (2012) mendapatkan batas kuantifikasi sebesar 0,004 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan batas kuantifikasi linkomisin yang didapatkan pada penelitian ini berdasarkan perhitungan rumus batas kuantifikasi adalah 4,19 $\mu\text{g/mL}$. Hal tersebut berarti 4,19 $\mu\text{g/mL}$ adalah

konsentrasi minimal yang mampu dideteksi oleh HPLC, karena obat yang digunakan pada penelitian Abualhasan dkk. (2012) adalah campuran spektinomisin 500 mg dan linkomisin 283 mg yang dilarutkan buffer sedangkan pada penelitian ini hanya menggunakan linkomisin saja yang dilarutkan dalam buffer.

Limit of Quantification (LOQ) atau Batas kuantifikasi

Batas kuantifikasi adalah konsentrasi terendah suatu analit yang dapat dianalisis secara kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat diukur dengan tepat dan sesuai kriteria (Abualhasan dkk., 2012). Penelitian Abualhasan dkk. (2012) mendapatkan batas kuantifikasi sebesar 0,013 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan batas kuantifikasi linkomisin yang didapatkan pada penelitian ini berdasarkan perhitungan rumus batas kuantifikasi adalah 13,98 $\mu\text{g/mL}$. Hal tersebut berarti 13,98 $\mu\text{g/mL}$ adalah konsentrasi minimal yang mampu dideteksi oleh HPLC, karena obat yang digunakan pada penelitian Abualhasan dkk. (2012) adalah campuran spektinomisin 500 mg dan linkomisin 283 mg yang dilarutkan buffer sedangkan pada penelitian ini hanya menggunakan linkomisin saja yang dilarutkan dalam buffer.

Kesimpulan

Dapat disimpulkan bahwa metode analisis kadar linkomisin menggunakan alat HPLC memiliki validitas yang baik. Metode analisis ini dapat digunakan sebagai salah satu langkah untuk mendeteksi kadar linkomisin pada ayam broiler.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan salah satu dari bagian penelitian yang terus dikembangkan. Ucapan terima kasih kepada pihak Laboratorium Farmakologi, Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan UGM yang telah memberikan fasilitas dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

Abualhasan M.N., Batrawi N., Sutcliffe O.B., Zaid A.N. (2012). A Validated Stability-Indicating HPLC Method for Routine Analysis of an Injectable Lincomycin

- and Spectinomycin Formulation. *Scientia Pharmaceutica* 978 – 986
- Adi, Eko Sasongko., Nurliza., Imelda. 2017. Analisis Permintaan Rumah Tangga terhadap Daging Ayam Broiler di Kabupaten Mempawah. *Jurnal Social Economic of Agriculture*. Volume 6, Nomor 2, hlm 75-83.
- Anastasia, Y. (2011). Teknik Analisis Residu Golongan Tetrasiklin Dalam Daging Ayam Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Buletin Teknik Pertanian* 16 (2): 68.
- Badan Pusat Statistik Republik Indonesia. 2022. Peternakan dalam Angka 2022. *Badan Pusat Statistik*. Halaman 13.
- Badan Pusat Statistik. (2020). Produksi Daging Ayam Ras Pedaging 2020. Retrieved July 28, 2022 from <https://www.bps.go.id/indicator/24/488/1/produksi-daging-ayam-ras-pedaging-menurut-provinsi.html>.
- Choirunnisa, Sheila, Wuryanto, M. Arie, Kusariana, Nissa, Saraswati, Lintang Dian. 2019. Survei Kandungan Residu Oksitetrasiklin pada Hati Ayam yang Dijual di Pasar Tradisional Kecamatan Banyumanik Kota Semarang. Volume 7, Nomor 4, hal: 447-453.
- Etikaningrum dan Iwantoro S. 2017. Kajian Residu Antibiotika pada Produk Ternak Unggas di Indonesia. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. Volume 5, Nomor 1, hlm 29-33.
- Food and Drug Administration (FDA). 2001. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, USA. Hal: 16.
- Guo Y, Xie X, Diao Z, Wang Y, Wang B, Xie K, Wang X, Zhang P. (2021). Detection and Determination of Spectinomycin and Lincomycin in poultry muscles and pork by ASE-SPE-CG-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Harmita. (2020). *Analisis Fisikokimia Kromatografi Volume 2*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Mahmoudi, R., P. Gasarbeygi, R. Norian, dan K. Farhoodi. (2014). “Chloramphenicol, Sulfonamide, and Tetracycline Residues in Cultured Rainbow Trout Meat (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 17, No. 2, Hal: 147-152.
- Kementrian Pertanian RI. (2017). *Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan*. Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. Hal 74.
- Kumar, P. R. dan Rajeevkumar, R. (2017). “A validated analytical hplc method for the quantification of lincomycin hydrochloride in bulk and solid dosage form.” *Int. J. App. Pharm.* 9(3): 42-44.
- Peraturan Menteri Pertanian. (2017). *Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 14/ Permentan/ PK. 350/5/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan*. Menteri Pertanian Republik Indonesia.
- Riveire J.E., Papich M.G. (2018). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics Tenth Edition*. USA: Willey Blackwell.
- Rohman A. (2009.) *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu. Hal: 217-235.
- Stenersen, J. (2004). *Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology*. CRP Press: London.
- Sugihartini, N., Fudholi, A., Pramono, S., dan Sismindari. (2014). Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigalokatekin Galat dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Pharmaciana*. 4 (2): 111-115.
- Vucicevic P.K., Cservenak R., Radulovic N. (2011). Development and Validation of Liquid Chromatography tandem mass spectrometry methods for the Determination of Genatmicinm Lincomycin, and Spectinomycin in the presence of their impurities in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 736 – 742.

Wang Bo, Y. Wang, X. Xie, Z. Diao, K. Xie, G. Zhiang, T. Zhang, G. Dai. (2020). Quantitative Analysis in Poultry Eggs by accelerated Solvent Extraction Coupled with Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Foods 2020 mdpi Journal*.

Yuningsih. (2009). Keberadaan Residu Antibiotika dalam Produk Peternakan (Susu dan Daging). *Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan: 48-54*