



KEMENTERIAN PERTANIAN

# **BULETIN PENGUJIAN MUTU OBAT HEWAN**

No : 30 Tahun 2021

ISSN : 0852-9612



**BALAI BESAR PENGUJIAN MUTU DAN SERTIFIKASI OBAT HEWAN  
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN  
KEMENTERIAN PERTANIAN**

**2021**

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah senantiasa kami panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga kami dapat menerbitkan buletin Pengujian Mutu Obat Hewan No.30 Tahun 2021. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada semua penulis naskah dan reviewer buletin ini yang telah bekerja keras untuk dapat menyelesaikan buletin ini tepat waktu.

Pada buletin kali ini kami hadirkan artikel-artikel ilmiah dari hasil-hasil kegiatan Pengkajian Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan. Pada buletin kali ini berisi kajian mutu vaksin Rabies, identifikasi vaksin AI secara molekuler, deteksi kontaminasi *Mycoplasma gallisepticum* pada vaksin virus *live*.

Dalam buletin edisi tahun 2021 ini kami juga mengangkat isu dunia terkait dengan resistensi antimikroba atau *Antimicrobial Resistance* (AMR). BBPMSOH sebagai institusi yang diamanatkan untuk melaksanakan penjaminan mutu obat hewan dan bertanggung jawab terhadap keamanan dan efektifitas mutu obat hewan yang beredar di Indonesia, berkomitmen untuk selalu memberikan perhatian dalam mencegah terjadinya AMR. Hal ini terbukti dengan beberapa kegiatan-kegiatan Pengkajian dan Pemantauan yang diarahkan dalam mendukung pencegahan penyebaran AMR. Beberapa artikel yang dimuat didalam buletin ini terkait hal tersebut antara lain Kepekaan Isolat *Escherichia coli* Terhadap Siprofloksasin dari Usap Kloaka Ayam Layer, Tinjauan Ilmiah Teknik Laboratorium untuk Identifikasi Bakteri dan Uji Kepekaan Antimikroba Secara *Fenotipe* dan *Genotipe* dan Pengkajian Mutu Sediaan Obat Hewan Siprofloksasin di Tujuh Provinsi di Indonesia.

Kami berharap dengan terbitnya buletin ini dapat memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya yang terkait dengan pengujian mutu obat hewan.

Semoga Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan ini dapat terus berkreasi untuk menerbitkan artikel-artikel ilmiah yang lebih informatif dan dapat memajukan dunia kesehatan hewan pada umumnya dan bidang obat hewan khususnya. Kami mengharapkan kritik dan saran yang membangun bagi penyempurnaan Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan edisi berikutnya.

Bogor, November 2021

Pimpinan Redaksi



## **KATA SAMBUTAN**

Bagi dunia kesehatan hewan di Indonesia, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) bukanlah sekedar lembaga pengujian obat hewan. Lembaga ini menjadi kebanggaan pemerintah Indonesia karena merupakan negara kedua setelah Jepang di Asia Pasifik yang memiliki laboratorium pengujian mutu dan sertifikasi obat hewan. Hal ini makin diakui sebagai terdepan di regional Asia Tenggara setelah sidang tahunan ke-10 ASEAN *Sectoral Working Group on Livestock (ASWGL)* bulan Agustus 2002 di Penang, Malaysia dan BBPMSOH ditetapkan sebagai laboratorium penguji mutu vaksin hewan yang diakui di tingkat ASEAN. Sejak itu BBPMSOH sudah dilakukan asesmen sebanyak 4 kali. Terakhir diajukan lagi pada tahun 2018 di Cambodia. Hasil asesmen sudah disetujui dalam pertemuan ANFPV, ASWGL dan SOM-AMAF pada tanggal 22 Juli 2020 sebagai ASEAN *Recognition of Reference Laboratories For Animal Vaccine Testing* dan sudah ditetapkan pada pertemuan ASEAN *Minister on Agriculture and Forestry (AMAF)* pada bulan November 2020.

BBPMSOH mempunyai tugas lingkup nasional dalam menjamin tersedianya obat hewan yang memenuhi standar mutu dalam upaya mendukung suksesnya pembangunan industri peternakan. Sebagai satu-satunya lembaga pengujian mutu obat hewan di Indonesia, BBPMSOH sebagai unit pelaksana teknis dari Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian berperan penting dalam penjaminan mutu obat hewan yang beredar di Indonesia. Dalam mendukung salah satu tugas pokok dan fungsinya maka BBPMSOH melaksanakan pemantauan dan pengkajian mutu obat hewan setiap tahun yang bertujuan untuk monitoring mutu obat hewan yang sudah diregistrasi dan mengkaji efek sampingnya di lapangan. Hasil monitoring dan kajian tersebut perlu didesiminasikan kepada masyarakat luas pada umumnya dan dunia kesehatan hewan khususnya. Oleh karena itu Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan hadir sebagai media untuk penyebar luasan informasi ilmiah yang diharapkan dapat memberi manfaat bagi dunia kesehatan hewan.

Bogor, November 2021

Kepala Balai Besar,

**drh. Maidaswar, M.Si**  
NIP. 196705191994031001



## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>i</b>
<b>KATA SAMBUTAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>iii</b>
<b>1. Pengkajian Mutu Sediaan Obat Hewan Siprofloksasin Di Tujuh Provinsi Di Indonesia</b> .....	<b>1</b>
<i>Siti Khomariyah, Maria Fatima Palupi, Ambarwati, Rosana Anita Sari, Emi Rusmiati, Nafisah Idrishanty, Luckyana Carry</i>	
<b>2. Kepekaan Isolat <i>Escherichia coli</i> Terhadap Siprofloksasin dari Usap Kloaka Ayam Layer</b> .....	<b>10</b>
<i>Nurhidayah, Maria Fatima Palupi, Novida Aryani, Indriyana, Eli Nugraha, Dyah Widyarimbi</i>	
<b>3. Deteksi Kontaminasi <i>Mycoplasma gallisepticum</i> Pada Vaksin Virus Live dengan Metode <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> Konvensional</b> .....	<b>17</b>
<i>Ernes Andesfha, Joen Firmanta P, Istiyarningsih, Dina Kartini, Sarji, Meutia Hayati, Deden Amijaya, Neneng Atikah, Citra Patrianegari, Sri Arofah.</i>	
<b>4. Identifikasi Molekuler Sampel Vaksin Avian Influenza (Ai) Inaktif Tahun 2019 -2020 Dengan Metode Konvensional Reverse <i>Transcription-Polymerase Chain Reaction (conRT-PCR)</i></b> .....	<b>27</b>
<i>Irma Rahayuningtyas, Dina Kartini, Dewi Astuti, Sri Suryanti, Ketut Karuni Nyanakumari Natih</i>	
<b>5. Kajian Mutu Vaksin Rabies Tahun 2011-2020</b> .....	<b>39</b>
<i>Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Ferry Ardiawan, Dodo Hermawan</i>	
<b>6. Tinjauan Ilmiah Teknik Laboratorium untuk Identifikasi Bakteri dan Uji Kepekaan Antimikroba Secara Fenotipe dan Genotipe</b> .....	<b>51</b>
<i>Muhammad Zahid, Puji Rahayu, Riksa Desitania, Isnindar</i>	

## PENGAJIAN MUTU SEDIAAN OBAT HEWAN SIPIROFLOKSASIN DI TUJUH PROVINSI DI INDONESIA

\*Siti Khomariyah, Maria Fatima Palupi, Ambarwati, Rosana Anita Sari, Emi Rusmiati, Nafisah Idrishanty, Luckyana Carry

Unit Uji Farmasetik dan Premiks  
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340  
\* email : drhsitikhomariyah@gmail.com

### ABSTRAK

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan kuinolan yang boleh digunakan di hewan produksi di Indonesia. Pengkajian mutu sediaan obat hewan siprofloksasin bertujuan untuk mendapatkan data mutu obat hewan siprofloksasin yang beredar di Indonesia. Sebanyak 96 sampel produk siprofloksasin telah diambil dari tujuh provinsi di Indonesia yaitu Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Banten, Sumatera Barat, Sumatera Utara dan Sulawesi Selatan. Pengujian mutu siprofloksasin diawali dengan uji umum dengan melihat keseragaman warnanya. Uji khusus terdiri dari dua uji yaitu uji identitas dan uji kadar dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Uji identitas dinyatakan positif apabila panjang gelombang maksimum yang terbentuk dari larutan sampel sama dengan larutan standar. Uji kadar diperoleh dengan membandingkan nilai absorbansi larutan standar dan sampel pada panjang gelombang maksimum yang dihasilkan yaitu 272 nm. Berdasarkan hasil uji diperoleh semua sampel siprofloksasin menunjukkan keseragaman warna, uji identitas positif, dan uji kadar memiliki rentang nilai 90 – 110 %. Data tersebut menunjukkan bahwa 96 sampel produk siprofloksasin yang diambil dari tujuh provinsi memenuhi persyaratan mutu.

**Kata Kunci : Siprofloksasin, Mutu, Warna, Identitas, Kadar.**

### ABSTRACT

*Ciprofloxacin is a quinolan antibiotic that is used for animal production in Indonesia. Study of the quality of the veterinary drug ciprofloxacin aims to obtain data on the quality of the veterinary drug ciprofloxacin circulating in Indonesia. A total of 96 samples of ciprofloxacin products were taken from seven provinces in Indonesia, namely West Java, Central Java, East Java, Banten, West Sumatra, North Sumatra and South Sulawesi. Testing the quality of ciprofloxacin begins with a general test by looking at the color uniformity. The specific test consists of two tests, namely the identity test and the concentration test using a UV-Vis spectrophotometer. The identity test is confirmed positive if the maximum wavelength generated from the sample solution is the same as the standard solution. The concentration test was obtained by comparing the absorbance values of the standard and sample solutions at the maximum wavelength produced, namely 272 nm. Based on the test results, all samples of ciprofloxacin showed color uniformity, the identity test was positive and the concentration test had a value range of 90-110%. These data indicate that 96 samples of ciprofloxacin products taken from seven provinces met the quality requirements.*

**Keywords : Ciprofloxacin, Quality, Color, Identity, Content.**

## PENDAHULUAN

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon yang termasuk dalam antibiotik spektrum luas, memiliki profil keamanan dan efektivitas yang baik melawan organisme patogen dibandingkan dengan kelas antibiotik lainnya<sup>(4)</sup>. Siprofloksasin bekerja dengan menghambat kinerja enzim topoisomerase IV dan topoisomerase II (DNA gyrase). Enzim tersebut merupakan komponen dasar yang diperlukan bakteri dalam perbaikan DNA, transkripsi, rekombinasi dan replikasi<sup>(3)</sup>

Siprofloksasin sering direkomendasikan dalam dunia kesehatan hewan untuk penanganan kasus infeksi pada saluran pernafasan, saluran pencernaan dan saluran urinaria yang disebabkan oleh *Campylobacter*, *E. coli*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*, *Pasteurella* dan *Salmonella sp*<sup>(5)</sup>. Adanya rekomendasi tersebut membuat banyaknya obat hewan yang mengandung siprofloksasin dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dengan antibiotik yang lain ditemukan di lapangan. Berdasarkan Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi XII tahun 2019, terdapat 22 produk obat hewan yang mengandung siprofloksasin yang telah mendapatkan nomor pendaftaran atau registrasi.

Adanya nomor registrasi memudahkan Pemerintah dalam pengawasan semua obat hewan yang beredar di wilayah Republik Indonesia. Hal tersebut sesuai dengan Peraturan Pemerintah Nomor 25 Tahun 2000 tentang Kewenangan Pemerintah dan Kewenangan Provinsi sebagai Daerah Otonom yang mempunyai kewajiban untuk melakukan pengawasan terhadap pembuatan, penyediaan, peredaran serta pemakaian obat hewan. Mutu obat hewan merupakan salah satu aspek penting dalam penyediaan dan penggunaan obat hewan sehingga perlu dilakukan pengujian untuk membuktikan mutu dari obat hewan tersebut. Pengujian

mutu adalah proses kegiatan untuk menilai khasiat dan keamanan sediaan obat hewan. Pernyataan tersebut terdapat dalam ketentuan umum pasal 1 Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 695/Kpts/TN.260/8/96. Mutu obat akan berpengaruh secara langsung maupun tidak langsung terhadap keamanan dan keefektifan obat.

Pengkajian mutu sediaan obat hewan siprofloksasin bertujuan untuk mendapatkan data mutu obat hewan siprofloksasin yang beredar di Indonesia. Data tersebut diharapkan dapat bermanfaat dalam rangka penjaminan obat hewan yang berkualitas di dunia Kesehatan Hewan.

## MATERI DAN METODE

### Bahan:

Sebanyak 96 sampel produk siprofloksasin sediaan serbuk dibeli dari produsen/distributor/*poultry shop* dari tujuh provinsi di Indonesia yaitu Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Banten, Sumatera Barat, Sumatera Utara dan Sulawesi Selatan. Masing – masing provinsi diambil 12 sampel Siprofloksasin yang telah memiliki nomor registrasi dengan ketentuan nama sampel, ukuran serta nomor produksi sama. Bahan yang digunakan yaitu *distilled water*, standar siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Jerman), Natrium Hidroksida (Merck, Jerman).

### Peralatan:

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik (Shimadzu AP 225 WD, Jepang), timbangan elektrik (Shimadzu EB – 340 HW, Jepang), labu takar 100 mL, labu takar 1000 ml, botol duran 1000 mL, botol timbang, sendok timbang, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, pipet ukur, *cuvet* dan spektrofotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu, Jepang).



## Prosedur:

### Pembuatan Larutan NaOH 0,1 N

Timbang empat gram NaOH, masukkan ke dalam labu takar 1000 ml, larutkan menggunakan 100 ml *distilled water*. Setelah larut, tambahkan *distilled water* sampai tanda batas. Masukkan *magnetic stirrer* ke dalam labu takar tersebut, campurkan hingga homogen. Pindahkan NaOH ke dalam botol duran 1000 ml dan tutup rapat

### Pengujian Mutu Siprofloksasin

Pengujian mutu obat hewan diawali dengan uji umum yang kemudian dilanjutkan dengan uji khusus. Metode yang digunakan untuk uji umum menggunakan FOHI Jilid II Edisi 4 Tahun 2009 dengan melihat keseragaman warnanya. Metode untuk uji khusus menggunakan Instruksi Kerja Pengujian Farmasetik Nomor 719 dengan menguji identitas dan kadarnya.

Standar siprofloksasin ditimbang seksama sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL NaOH 0,1 N. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan *distilled water* sampai didapatkan konsentrasi akhir 5 µg/mL. Sampel ditimbang setara dengan 100 mg siprofloksasin dan dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan *distilled water* sampai didapatkan konsentrasi akhir 5 µg/mL.

Uji khusus terdiri dari dua pengujian yaitu uji identitas dan uji kadar. Uji identitas dinyatakan positif apabila panjang gelombang maksimum yang terbentuk dari larutan sampel sama dengan larutan standar. Uji kadar diperoleh dengan membandingkan nilai absorbansi larutan standar dan larutan sampel pada panjang gelombang maksimum yang dihasilkan. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan pada rentang panjang gelombang antara 265-280nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sembilan puluh enam sampel siprofloksasin yang diambil di tujuh provinsi di Indonesia terdiri dari tiga macam merk dagang dan diproduksi oleh perusahaan lokal Indonesia. Sampel obat tersebut merupakan obat dengan sediaan serbuk yang hanya mengandung satu jenis antibiotik yaitu siprofloksasin. Hasil pengujian mutu sampel – sampel tersebut disajikan dalam Tabel 1. Mutu obat akan menentukan efek terapeutic yang dihasilkan. Salah satu aspek yang dapat ditinjau dari mutu obat hewan yaitu aspek stabilitas fisik dan kimia sesuai dengan kriteria yang dipersyaratkan<sup>(8)</sup>. Hal tersebut sesuai dengan pengujian mutu yang telah dilakukan di BBPMSOH dalam uji umum sebagai aspek stabilitas fisik dan uji identitas serta uji kadar sebagai aspek kimia.

Uji umum dilakukan berdasarkan pengamatan terhadap penampilan keseragaman warna. Berdasarkan hasil uji umum terhadap 96 sampel siprofloksasin didapatkan hasil bahwa semua warna sampel obat memiliki warna yang seragam. Adanya perubahan warna menunjukkan adanya ketidakstabilan selama penyimpanan obat. Hal tersebut dapat terjadi karena zat aktif yang terkandung dalam obat merupakan bahan kimia yang dapat bereaksi karena faktor lingkungan seperti panas, lembab, cahaya, mikroba dan debu<sup>(7)</sup>.

Uji identitas dilakukan dengan cara membandingkan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan larutan standar dan larutan sampel. Panjang gelombang maksimum yang dapat terbaca oleh spektrofotometer UV-Vis untuk siprofloksasin menggunakan NaOH 0,1 N adalah 272 nm<sup>(2)</sup>. Pernyataan tersebut sesuai dengan pengujian yang telah dilakukan di BBPMSOH yang menunjukkan panjang gelombang maksimum untuk siprofloksasin adalah 272 nm. Hasil Uji identitas menunjukkan semua sampel obat yang diambil di tujuh provinsi

tersebut mengandung zat aktif siprofloksasin.

Menurut Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 695/Kpts/TN.260/8/96 Tentang Syarat dan Tata Cara Pendaftaran dan Pengujian Mutu Obat Hewan pasal 19 bahwa Pengujian mutu terhadap sampel obat hewan didasarkan pada persyaratan minimal sebagaimana tercantum pada Farmakope Obat Hewan Indonesia atau Farmakope Obat Hewan negara lain, yang sistem pengawasan obat hewan sekurang-kurangnya setara dengan sistem pengawasan

obat hewan di Indonesia. Persyaratan kadar untuk siprofloksasin yaitu mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0%. Uji kadar dilakukan dengan membandingkan absorbansi larutan standar dan larutan sampel pada panjang gelombang maksimum yang dihasilkan. Sembilan puluh enam sampel siprofloksasin yang telah diuji kadarnya menunjukkan adanya variasi hasil namun masih dalam batas persyaratan kadar.

Tabel 1. Hasil uji pengkajian mutu obat hewan siprofloksasin di tujuh provinsi di Indonesia

No	Kode Sampel	Provinsi	Kab/Kota	Uji umum	Uji khusus	
					Identitas	Uji Kadar
1	PF-0012021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	97,87%
2	PF-0022021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	98,65%
3	PF-0032021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	97,54%
4	PF-0042021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	101,70%
5	PF-0052021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	96,38%
6	PF-0062021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	98,35%
7	PF-0072021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	102,78%
8	PF-0082021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	104,10%
9	PF-0092021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	97,70%
10	PF-0102021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	101,08%
11	PF-0112021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	100,19%
12	PF-0122021	Jawa Timur	Kab. Sidoarjo	Merah muda seragam	Positif	97,43%
13	PF-0132021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	100,92%
14	PF-0142021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	100,53%
15	PF-0152021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	98,65%
16	PF-0162021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	100,23%

No	Kode Sampel	Provinsi	Kab/Kota	Uji umum	Uji khusus	
					Identitas	Uji Kadar
17	PF-0172021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	104,05%
18	PF-0182021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	102,99%
19	PF-0192021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	98,02%
20	PF-0202021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	100,66%
21	PF-0212021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	103,96%
22	PF-0222021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	99,70%
23	PF-0232021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	97,26%
24	PF-0242021	Sumatera Utara	Kota Medan	Merah muda seragam	Positif	100,63%
25	PF-0252021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	100,91%
26	PF-0262021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	103,15%
27	PF-0272021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	100,82%
28	PF-0282021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	100,67%
29	PF-0292021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	104,20%
30	PF-0302021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	104,63%
31	PF-0312021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	101,57%
32	PF-0322021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	99,78%
33	PF-0332021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	99,57%
34	PF-0342021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	97,99%
35	PF-0352021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	100,14%
36	PF-0362021	Jawa Tengah	Kab. Karang Anyar	Merah muda seragam	Positif	100,29%
37	PF-0372021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	100,01%
38	PF-0382021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	100,03%
39	PF-0392021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	101,74%
40	PF-0402021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	98,26%

No	Kode Sampel	Provinsi	Kab/Kota	Uji umum	Uji khusus	
					Identitas	Uji Kadar
41	PF-0412021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	101,58%
42	PF-0422021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,93%
43	PF-0432021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	100,74%
44	PF-0442021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,64%
45	PF-0452021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	100,95%
46	PF-0462021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	101,42%
47	PF-0472021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,27%
48	PF-0482021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	102,20%
49	PF-0492021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,36%
50	PF-0502021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,44%
51	PF-0512021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,94%
52	PF-0522021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	100,13%
53	PF-0532021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	100,70%
54	PF-0542021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	100,63%
55	PF-0552021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,36%
56	PF-0562021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	99,36%
57	PF-0572021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	101,28%
58	PF-0582021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	101,67%
59	PF-0592021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	101,28%
60	PF-0602021	Jawa Barat	Kab. Bandung	Merah muda seragam	Positif	101,13%
61	PF-0612021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	96,49%
62	PF-0622021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	95,60%
63	PF-0632021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	96,88%
64	PF-0642021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	97,52%

No	Kode Sampel	Provinsi	Kab/Kota	Uji umum	Uji khusus	
					Identitas	Uji Kadar
65	PF-0652021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	95,57%
66	PF-0662021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	98,63%
67	PF-0672021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	97,14%
68	PF-0682021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	98,04%
69	PF-0692021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	97,15%
70	PF-0702021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	96,93%
71	PF-0712021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	95,78%
72	PF-0722021	Banten	Kab. Tangerang	Putih seragam	Positif	95,59%
73	PF-0732021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	99,79%
74	PF-0742021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	98,67%
75	PF-0752021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	98,17%
76	PF-0762021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	99,19%
77	PF-0772021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	98,56%
78	PF-0782021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	101,42%
79	PF-0792021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	100,65%
80	PF-0802021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	98,69%
81	PF-0812021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	99,79%
82	PF-0822021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	98,58%
83	PF-0832021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	101,23%
84	PF-0842021	Sumatera Barat	Kota Payakumbuh	Merah muda seragam	Positif	98,75%
85	PF-0852021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	101,69%
86	PF-0862021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	101,55%
87	PF-0872021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	97,91%
88	PF-0882021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	96,95%
89	PF-0892021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	96,70%
90	PF-0902021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	96,81%

No	Kode Sampel	Provinsi	Kab/Kota	Uji umum	Uji khusus	
					Identitas	Uji Kadar
91	PF-0912021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	98,33%
92	PF-0922021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	99,18%
93	PF-0932021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	100,19%
94	PF-0942021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	101,09%
95	PF-0952021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	98,16%
96	PF-0962021	Sulawesi Selatan	Kota Makasar	Merah muda seragam	Positif	98,22%

Penyimpanan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi mutu obat hewan. Kesalahan-kesalahan yang sering terjadi selama penyimpanan antara lain ketidaksesuaian suhu, kelembaban dan intensitas cahaya pada tempat penyimpanan obat <sup>(1)</sup>. Suhu penyimpanan yang terlalu tinggi berpengaruh pada stabilitas kimia obat dan memiliki efek buruk pada sifat fisik beberapa jenis formulasi sediaan. Suhu tinggi mempercepat reaksi oksidasi, reduksi dan hidrolisis yang menyebabkan degradasi obat. pH asam dan basa mempengaruhi laju dekomposisi sebagian besar obat. Kelembaban berpengaruh terhadap air dalam mengkatalisis reaksi kimia seperti oksidasi, hidrolisis dan reduksi serta mendorong pertumbuhan mikroba. Cahaya mempengaruhi stabilitas obat melalui efek termal yang menyebabkan oksidasi <sup>(6)</sup>.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Sebanyak 96 sampel produk siprofloksasin yang diambil dari tujuh provinsi di Indonesia telah memenuhi persyaratan mutu obat hewan. Mutu obat sangat dipengaruhi oleh tata cara penyimpanan obat sesuai dengan suhu, kelembaban dan intensitas cahaya yang tertera pada label kemasan obat, sehingga perlu menjadi perhatian penting bagi produsen obat hewan, distributor, *poultry shop* dan peternakan di Indonesia.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Ardiningtyas, Bondan , Syahreni dan Dwi. 2019. Gambaran Penyebab dan Kerugian karena Obat Rusak dan Kedaluarsa di Apotek Wilayah Kota Yogyakarta. Research Gate.
2. Grewal, A.S., Patro, S.K., Kanungo, S.K. dan Bhardwaj, S.K. 2012. Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Ciprofloxacin and Ornidazole in Dosage Form. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, Vol.3 No. 8.
3. Hawkey, P.M. 2003. Mechanisms of Quinolone Action and Microbial Response. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Suppl. S1, Hal. 29 – 35.
4. Herlin, K., Segerdahl, M., Gustafsson, L.L. dan Kalso, E. 2000. Methadone, Ciprofloxacin and Adverse Drug Reactions. The Lancet, Vol. 356.
5. Khan, G.J., Khan, R.A., Majeed, I. dan Siddiqu, F.A. 2015. Ciprofloxacin : The Frequent Use in Poultry and Its Consequences on Human Health. Professional Med Journal, Vol. 22 No. 1 Hal. 1-5.
6. Mansour, O., Isbera, M., Ismail, G. dan Mayya, G. 2018. The Effect of Temperature and Moisture on The Physical and Chemical Stability of Furosamide Tablets (40 MG) Marketed in Syria. World Journal of Pharmaceutical Research, Vol.7, Issue 13.
7. Peace, N., Olubukola, O dan Moshood, A. 2012. Stability of Reconstituted Amoxicillin Clavulanate Potassium Under Stimulated in Home Storage Conditions. Journal of Applied Pharmaceutical Science, Vol.02, Hal: 28-31.
8. Yuda, P.E.S.K. dan Suen, N.M.D.S. 2016. Pengaruh Suhu Penyimpanan terhadap Kadar Tablet Vitamin C yang Diukur Menggunakan Metode Spektrofotometer UV-VIS. Jurnal Ilmiah Medicamento, Vol. 2 No. 1.

## KEPEKAAN ISOLAT *ESCHERICHIA COLI* TERHADAP SIPROFLOKSASIN DARI USAP KLOAKA AYAM LAYER

\*Nurhidayah, Maria Fatima Palupi, Novida Aryani, Indriyana, Eli Nugraha, Dyah Widyarimbi

Unit Uji Farmasetik dan Premiks  
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur – Bogor, 16340  
\* email : nurdrh2@gmail.com

### ABSTRAK

Resistensi antimikroba telah menjadi ancaman global bagi kesehatan hewan dan manusia serta berdampak kerugian secara ekonomis. Pengawasan terhadap perkembangan kondisi resistansi antimikroba perlu dilakukan secara terus-menerus dalam upaya pengendaliannya, salah satu diantaranya terhadap antibiotik siprofloksasin. Tujuan dari studi ini adalah untuk mengetahui kepekaan antibiotik siprofloksasin terhadap isolat *Escherichia coli* dari peternakan ayam layer. Isolat *E. coli* yang diuji adalah 327 isolat yang diisolasi dari pool usap kloaka yang berasal dari 109 flock ayam layer dari tujuh provinsi di Indonesia (Jawa Timur, Jawa Barat, Jawa Tengah, Banten, Sulawesi Selatan dan Sumatera Utara) Uji kepekaan antibiotik siprofloksasin terhadap isolat *E. coli* dengan menggunakan metode agar dilusi diperoleh nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan interpretasinya mengacu pada *Clinical and Laboratory Standar Institute (CLSI 2020)*. Hasil uji kepekaan *Escherichia coli* terhadap siprofloksasin menunjukkan bahwa 166 isolat adalah resistan (50,76%), 30 isolat adalah intermediet (9,17%) dan 131 isolat adalah sensitif (40,06%). Hal ini juga menunjukkan bahwa prevalensi resistansi siprofloksasin pada *E. coli* di ayam layer dari tujuh provinsi yang diambil adalah 50,76% (CI 95%; CL 45,37% - 56,14%)

**Kata kunci:** siprofloksasin, resistansi antibiotik, broiler, *E. coli*

### ABSTRACT

*Antimicrobial resistance has been a global threat to animal and human health, also affected the economic loss. . Monitoring of the development of antimicrobial resistance conditions needs to be carried out continuously in an effort to control it, one of which is the antibiotic ciprofloxacin. The purpose of this study was to determine the susceptibility of ciprofloxacin antibiotic to E coli isolates from layer flocks. The samples used in this study were 327 isolates of Escherichia coli. Isolates were taken from cloacal swab pools from 109 layer flocks of seven provinces in Indonesia (East Java, West Java, Central Java, Banten, South Celebes, and North Sumatera). Susceptibility test to the ciprofloxacin antibiotic to E. coli isolates was carried out using the agar dilution method to obtain the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values and the interpretation refers to the CLSI (2020). The results of the susceptibility test of Escherichia coli to ciprofloxacin showed that 166 isolates were resistant (50.76%), 30 isolates were intermediate (9.17%) and 131 isolates were sensitive (40.06%). It also showed that the prevalence of ciprofloxacin resistance in E. coli in layer chickens from the seven provinces taken was 50.76% (95% CI; CL 45.37% - 56.14%)*

**Keywords :** ciprofloxacin, antimicrobial resistance, broiler, *E. coli*



## PENDAHULUAN

Dalam istilah terapeutik, resistansi antimikroba berarti bahwa mikroorganisme tidak dihambat oleh konsentrasi agen antimikroba yang dapat dicapai dalam cairan tubuh mengikuti dosis terapi standar<sup>(3)</sup>. Resistansi antimikroba telah menjadi ancaman besar bagi kesehatan masyarakat dan hewan secara global. Hal ini juga berpengaruh pada keamanan pangan dan ketahanan pangan, serta kesejahteraan ekonomi<sup>(24)</sup>. Jika perkembangan resistansi antimikroba tidak dikendalikan, maka dampak yang terjadi yaitu menurunkan efikasi antimikroba, kegagalan atau lamanya pengobatan dan perawatan, meningkatnya angka morbiditas dan risiko kematian, penyakit, serta biaya kesehatan menjadi lebih tinggi<sup>(14)</sup>.

Pengawasan terhadap perkembangan resistansi antimikroba perlu dilakukan secara terus-menerus salah satu diantaranya terhadap antibiotik siprofloksasin. Siprofloksasin adalah antimikroba spektrum luas golongan fluorokuinolon yang digunakan tidak hanya pada hewan, tapi juga digunakan pada manusia.. Hasil survei penggunaan antimikroba di peternakan ayam pada tahun 2017 menunjukkan bahwa sediaan obat hewan kombinasi siprofloksasin dan tilosin masuk dalam lima besar antibiotik yang digunakan di peternakan ayam, yaitu 5,1%<sup>(7)</sup>. Ada pun pada manusia, siprofloksasin merupakan antibiotika ketiga paling banyak digunakan selama tahun 2012-2014 di Puskesmas maupun di Rumah Sakit<sup>(21)</sup>. Hal ini menjadi perhatian utama untuk dilakukannya pengawasan terhadap resistansi antibiotik siprofloksasin.

*Escherichin coli* adalah bakteri yang bersifat komensal yang normal ditemukan pada saluran pencernaan manusia dan hewan maupun di lingkungan. Beberapa galur *E. coli* bersifat patogen, mengkontaminasi pangan dan menyebabkan diare<sup>(20)</sup>. Bakteri

ini menyebabkan kolibasilosis pada ayam yang berakibat pada kerugian ekonomi pada industri unggas<sup>(23)</sup>. Selain itu *E. coli* dapat berperan penyebaran gen resisten melalui transfer materi genetik resisten kepada bakteri lainnya, yang kemudian dapat diteruskan ke manusia melalui produk pangan asal hewan atau melalui kontak langsung dengan hewan<sup>(15)</sup>. *Escherichin coli* sering digunakan dalam program monitoring dan surveilans sebagai indikator, serta memberikan informasi tentang potensi reservoir gen resistansi antimikroba yang dapat ditransfer ke bakteri patogen<sup>(26)</sup>.

Peternakan ayam layer merupakan industri perunggasan yang dapat berperan sebagai faktor kejadian resistansi antimikroba akibat penggunaan antimikroba yang tidak bijak. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat kepekaan antibiotik siprofloksasin terhadap *E. coli* yang diisolasi dari peternakan ayam layer sehingga dapat mengetahui prevalensi dari resistansi *E.coli* terhadap siprofloksasin. .

## MATERI DAN METODE

### Materi dan Alat

Materi yang digunakan untuk pengujian yaitu standar siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Germany), NaCl (Merck, Jerman), *Heart Infusion Broth* (HIB, BD Bacto™-USA), *Stock Culture Agar* (SCA, BD Bacto™-USA), *Mueller-Hinton Agar* (MHA, Oxoid Ltd.-United Kingdom), Levine's Eosin Methylene Blue Agar (L-EMBA, Oxoid Ltd-United Kingdom), Media Sulfide Indole Motility (SIM, Oxoid Ltd-United Kingdom), Media Methly Red-Voges Proskauer (MRVP, Oxoid Ltd-United Kingdom), Media Simon Citrate (Oxoid Ltd-United Kingdom), reagen Kovac's (Merck-Jerman), gliserol (Merck-Jerman), dan *E. coli* ATCC 25922.

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik (Shimadzu, Jepang), cawan petri, tabung reaksi, *autoclave* (Tomy Seiko,

Jepang), *waterbath*, inkubator (Hirasawa, Jepang), densitometer (Biosan, Latvia), mikroplate (Biologik, Eropa), Replica plater (Sigma-Aldrich, Jerman), pipet volumetrik (pyrex, Jepang), Pipet channel dan pipet tip (Eppendorf, Jerman).

## Metode

### 1. Pengambilan Sampel

Sampling apus kloaka akan dilakukan di flock peternakan ayam petelur di tujuh provinsi dengan populasi ayam petelur tertinggi di Indonesia berdasarkan DJPKH (2019). Jumlah flock yang diambil dihitung berdasarkan FAO (2020) dengan rumus  $N = [Z^2 \times (P) \times (1-P)] / e^2$ . Dimana N adalah jumlah sampel, Z adalah tingkat konfidensi 95% (1,96), P adalah nilai dugaan prevalensi resistan, e = nilai presisi (10%). Nilai dugaan prevalensi resistansi siprofloksasin yang digunakan adalah hasil kajian Palupi *et al.* (2020) yaitu 59.75%. Sehingga didapatkan jumlah minimal sampel adalah 97 flock (kandang). Jumlah flock/kandang yang diambil per provinsi adalah proporsional sesuai dengan jumlah populasi ayam layer tiap provinsi.

Pengambilan sampel dilakukan di peternakan ayam layer yang berlokasi di Jawa Timur, Jawa Barat, Jawa Tengah, Banten, Sulawesi Selatan dan Sumatera Utara. Tiap flock/kandang diambil 5 ekor ayam sehat secara acak dan diambil apus kloaka dengan menggunakan swab steril dan dimasukkan dalam satu tabung yang berisi *Phosphate Buffer Saline* steril, lalu disimpan pada suhu 2-8°C untuk jangka waktu 24-72 jam<sup>(13,14)</sup>.

### 2. Isolasi dan Identifikasi *Escherichin coli*

Sebanyak 1 mL suspensi *pool* apus kloaka ditambahkan ke dalam 9 mL HIB lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian ditanam pada media L-EMBA dengan inkubasi suhu 37°C selama 18-24 jam. Dari tiap

*pool* diambil tiga koloni yang diduga *E. coli* (berdiameter 2-3 mm, warna metalik kehijauan) dan ditanam kembali pada media L-EMBA sehingga diperoleh koloni yang seragam. Selanjutnya dilakukan konfirmasi dengan uji IMViC (Indole, MR, VP, Citrate). Hasil uji IMViC *E. coli* adalah Uji Indol positif (terbentuk cincin merah), uji MR positif (warna merah), uji VP negatif (tidak berubah warna), uji *citrate* negatif (warna hijau). Sebagai kontrol, digunakan *E. coli* ATCC 25922. Isolat *E. coli* diperoleh sebanyak 327 isolat dan disimpan pada media SCA pada suhu 4-8°C dan gliserol 10% pada suhu -20°C<sup>(13,14)</sup>.

### 3. Uji Kepekaan Antibiotik

Uji kepekaan antibiotik dilakukan dengan menggunakan metode agar dilusi. Standar siprofloksasin ditimbang untuk membuat stok larutan standar, lalu dilakukan pengenceran serial dari 0,25-16 µg/mL. Sebanyak 2 mL masing-masing konsentrasi larutan standar ditambahkan 18 mL MHA yang masih cair (50°C), dihomogenkan dan dibiarkan membeku pada cawan petri. Isolat *E. coli* dan strain bakteri kontrol ditanam pada media MHA dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam sehingga didapatkan koloni tunggal. Sebanyak 3-5 koloni ditambahkan pada 2 mL NaCl fisiologis dan dihomogenkan, lalu setarakan kekeruhannya hingga 0.5 Mc Farland standard ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL). Sebanyak 1 mL inokulum bakteri tersebut ditambahkan pada 9 mL NaCl fisiologis ( $1 \times 10^7$  CFU/mL), lalu sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam *microplate* dan inokulasi dengan multiple inokulator 3-mm pin (2 µL) pada masing-masing media MHA yang mengandung siprofloksasin. Media MHA kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati untuk menentukan KHM dan dilakukan interpretasi sesuai CLSI (2020).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji kepekaan antibiotik pada 327 isolat *E. coli* dari sampel usap kloaka ayam layer terhadap siprofloksasin menunjukkan bahwa 166 isolat adalah resistan (50,76%), 30 isolat adalah intermediet (9,17%) dan 131 isolat adalah sensitif (40,06%) sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 1. Adapun distribusi nilai KHM dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil pengkajian ini menunjukkan bahwa tingkat prevalensi dari siprofloksasin di *E. coli* adalah 50,76% (95% CI; CL 45.37%-56.14%). Berdasarkan EMA (2018), prevalensi 50,76% (95% CI; CL 45.37%-56.14%) termasuk dalam kategori tinggi karena prevalensinya diatas 20%. Nilai ini hampir sama dengan penelitian-penelitian resistansi siprofloksasin pada ayam dilakukan oleh Niasiono AB *et al.* (2019), Palupi *et al.* (2020), dan Tyaningsih *et al.* (2021). Penelitian yang dilakukan oleh Niasiono AB *et al.* (2019) menunjukkan bahwa resistansi *E. coli* terhadap siprofloksasin adalah 45,9%. Penelitian Niasiono AB *et al.* (2019) dilakukan pada 74 isolat *E. coli* yang didapatkan dari sampel *boot swab* peternakan ayam broiler di Kabupaten Subang, Jawa Barat <sup>(17)</sup>. Tingkat resistansi pada Palupi *et al.* (2020) adalah

59,75% yang didapatkan dari 159 isolat *E. coli* yang berasal dari usap kloaka broiler. Sedangkan hasil Tyaningsih *et al.* (2021) menunjukkan bahwa resistansi terhadap siprofloksasin adalah 67% yang berasal dari 60 isolat *E. coli* dari apus kloaka ayam broiler di pasar tradisional <sup>(24)</sup>.

Tingkat resistansi pengkajian ini didapatkan lebih tinggi dari yang didapatkan Ariyani *et al.* (2018). Penelitian Ariyani *et al.* (2018) menunjukkan tingkat resistansi siprofloksasin adalah 14,77%. Akan tetapi, tingkat resistansi Ariyani *et al.* (2018) hanya dilakukan pada *E. coli* patogen, sedangkan pada pengkajian ini uji resistansi dilakukan pada semua isolat baik yang patogen ataupun komensal. Oleh sebab itu sangat penting untuk melakukan uji AST *E. coli* bakteri komensal karena sangat berpengaruh terhadap tingkat prevalensi.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Hung *et al.* (2009) di Taiwan, kecepatan resistansi siprofloksasin atau levofloksasin meningkat dari 2,8% pada tahun 1998–2003 menjadi 11,8% tahun 2004–2007. Pada penelitian Gosling *et al.* (2009) juga menunjukkan resistansi *E. coli* terhadap siprofloksasin yang tinggi yaitu pada kalkun sebesar 22,4% pada flock breeding dan 60,9% pada flock ayam broiler.

Tabel 1. Hasil uji kepekaan 327 isolat *E. coli* terhadap siprofloksasin dari *pool* usap kloaka pada ayam layer

	Interpretasi		
	Sensitif (KHM ≤ 0.25 µg/mL)	Intermediet (KHM = 0,5 µg/mL)	Resistan (KHM ≥ 1 µg/mL)
Jumlah isolat	131 (40,06%)	30 (9,17%)	166 (50,76%)

Tabel 2. Distribusi nilai KHM siprofloksasin dari 327 isolat *E. coli* dari pool usap kloaka ayam layer

Nilai KHM	Distribusi KHM (µg/mL)							
	≤ 0,25	0,5	*1	2	4	8	16	>16
Jumlah isolat	131	30	18	11	22	46	49	20

\*KHM > 1 µg/mL dinyatakan resistan terhadap siprofloksasin (CLSI 2020)

Mekanisme kerja siprofloksasin menghambat sintesis dan replikasi DNA dengan membentuk ikatan kompleks dengan enzim topoisomerase II (subunit  $\beta$  enzim DNA girase) atau topoisomerase IV. DNA gyrase menyebabkan pemutusan rantai tunggal pada DNA untuk supercoil selama replikasi atau transkripsi. DNA rantai tunggal yang putus tidak dapat diikat kembali dan terakumulasi menyebabkan kerusakan DNA rantai ganda <sup>(19)</sup>.

Mekanisme utama kejadian resistansi siprofloksasin sebagaimana golongan fluoroquinolon adalah terdapat modifikasi pada enzim topoisomerase II (subunit  $\beta$  enzim DNA girase) dan topoisomerase IV sehingga menyebabkan enzim tidak dapat diikat oleh fluorokuinolon. Menurut Fàbrega *et al.* (2009) terdapat empat mekanisme resistansi siprofloksasin pada *E. coli* yaitu: (a) Mengubah target, dimana terjadi mutasi gen kromosom (*gyrA*, *gyrB*, *parC* dan *parE*) sehingga mengurangi sensitifitas siprofloksasin; (b) pengurangan akumulasi siprofloksasin akibat mutasi gen pompa effluks, dimana terlibat gen kromosom (*marR*, *acrAB*, *tolC*, *soxS*, dan *rpoB*) serta gen yang dikodekan plasmid (*qepA* dan *oqxAB*); (c) pemblokiran fisik target siprofloksasin, dimana adanya gen resistan yang dimediasi plasmid (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, dan *qnrS*). Gen *qnr* mengkode pentapeptida yang memblokir aksi kuinolon pada DNA girase dan topoisomerase IV; dan (d) modifikasi enzim siprofloksasin dengan adanya keterlibatan gen resistan yang dimediasi plasmid (*aac(6)-Ib-cr*, *crpP*). Gen *aac(6)-Ib-cr* mengkode asetilase yang memodifikasi gugus amino dari piperazin cincin fluorokuinolon.

Resistansi antibiotik disebabkan oleh penggunaan antimikroba yang tidak tepat (*missuse*), berlebihan (*overuse*), dan tidak sesuai aturan (*unregulated*). Berdasarkan data Ditkeswan (2018) siprofloksasin masih banyak digunakan di peternakan unggas

untuk pencegahan (76,6%) dibandingkan dengan untuk pengobatan (22,5%). Selain itu, beberapa penggunaan antibiotik di peternakan tidak dipilih atau diawasi oleh dokter hewan. Pemahaman peternak mengenai penggunaan antibiotik masih kurang. Persepsi peternak mengenai penggunaan antibiotik adalah untuk meningkatkan ekonomi selain untuk pengobatan, yaitu meningkatkan produksi, ayam semakin sehat, mengurangi kematian, serta pencegahan <sup>(22)</sup>.

Strategi pencegahan terjadinya resistansi antibiotik di peternakan diantaranya yaitu pemilihan antibiotik sesuai dengan indikasi dan diagnosa yang tepat, serta penggunaannya sesuai dengan jumlah/dosis dan jangka waktu pemberian atau waktu henti obat <sup>(10)</sup>. Hindari penggunaan antibiotik yang masuk dalam *Highest Critically Important Antimicrobial for Human*, termasuk siprofloksasin, sebagai pilihan pertama pengobatan <sup>(25)</sup>. Tidak menggunakan antibiotik untuk pemacu pertumbuhan dan pencegahan. Menerapkan Manajemen peternakan yang baik (*Good Farming Practices*) seperti biosekuriti, vaksinasi, dan lain-lain. Penggunaan probiotik, prebiotik, herbal dan sebagainya sebagai alternatif pengganti antibiotic <sup>(16)</sup>. Perlunya meningkatkan pengawasan penggunaan antibiotik diberbagai sektor terkait dengan kesehatan hewan, serta pembinaan secara kontinu kepada pengguna agar antimikroba digunakan secara bijak

Siprofloksasin merupakan salah satu antibiotik dalam klasifikasi WHO (2019) yang masuk dalam *Highest Priority Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*. Enam jenis antimikroba dalam kategori *Highest Priority Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* adalah efalosporin (generasi ke-3, 4, dan 5), glikopeptid, makrolid, polimiksin, kuinolon, dan ketolide. Mengingat siprofloksasin memiliki posisi yang sangat penting bagi manusia dan pada pengkajian ini didapatkan

prevalensi yang tinggi maka penggunaan siprofloksasin sebaiknya pada hewan ternak hanya digunakan sebagai pilihan akhir atau jika pada kasus tertentu yang memang hanya memerlukan siprofloksasin.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil uji kepekaan *E. coli* terhadap siprofloksasin menunjukkan bahwa 166 isolat adalah resistan (50,76%), 30 isolat adalah intermediet (9,17%) dan 131 isolat adalah sensitif (40,06%). Hal ini juga menunjukkan bahwa prevalensi resistansi siprofloksasin pada *E. coli* di ayam layer dari tujuh provinsi yang diambil adalah tinggi yaitu 50,76% (CI 95%; CL 45,37%-56,14%). Siprofloksasin sebaiknya tidak sebagai pilihan pertama dalam pengobatan dan perlunya peningkatan pengawasan dan pembinaan penggunaan siprofloksasin di peternakan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ariyani N, Nurhidayah, Istianingsih, Ambarwati, Sari RA. 2018. Doxycycline and Ciprofloxacin Resistance In *Escherichia Coli* Isolated From Layer Feces. Prosiding Pertemuan AFFAVETI. Surabaya, pp.6-12.
2. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. M100 : *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* M100 30<sup>th</sup> Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, USA.
3. Coyle MB. 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology.
4. [Ditkeswan] Direktorat Kesehatan Hewan. 2018. Survey AMU (Penggunaan Antimikroba). Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Jakarta.
5. [DJPKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2019. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian [ID]: Jakarta
6. [EMA] European Medicine Agency. 2018. Guideline on the assessment of the risk to public health from antimicrobial resistance due to the use of an antimicrobial veterinary medicinal product in food producing animals (Draft 2). [Internet] [Diunduh 01 Oktober 2018]. Terdapat dalam [www.ema.europa.eu / docs / en\\_gb / document\\_library/scientific\\_guideline/2018/07/WC500252679.pdf](http://www.ema.europa.eu / docs / en_gb / document_library/scientific_guideline/2018/07/WC500252679.pdf)
7. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E dan Vila J. 2009. Review : Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology* 2(1), 40–61.
8. [FAO] Food and Agriculture Organisation of The United Nations. 2019. Monitoring and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria from healthy food animals intended for consumption. Regional Antimicrobial Resistance Monitoring and Surveillance Guidelines – Volume 1. Bangkok
9. Gosling RJ, Clouting CS, Randall LP, Horton RA dan Davies RH. 2012. Ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolated from turkeys in Great Britain. *Avian Pathology* 41(1), 83-89. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.640659>.
10. Humaida R. 2014. Strategy to Handle Resistance of Antibiotic. *J Majority* 3 (7) : 113-120.
11. Hung KH, Sheu BS, Chang WL, Wu HM, Liu CC, Wu JJ. 2019 Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter*. 2009 Feb;14(1):61-5.
12. Lupindu AM. 2017. Isolation and Characterization of *Escherichia coli* from Animals, Humans, and Environment. Intech <http://dx.doi.org/10.5772/67390>.
13. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013. Clinical Veterinary Microbiology. 2nd Ed. London (UK): Mosby Elsevier.
14. Marshall BM and Levy SB. 2011. Food Animals and Antimicrobials : Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* (4):718-33. doi: 10.1128/CMR.00002-11.
15. Naipospos TSP. 2019. Kurangi Antibiotik di Peternakan. Poultry Indonesia Vol.XIV.
16. Niasono AB, Latif H, Purnawarman T. 2019. Resistansi Antibiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Peternakan Ayam Pedaging di Kabupaten Subang, Jawa Barat. *Jurnal Veteriner* 2019 Vol. 20 No. 2 : 187 – 195. DOI: 10.19087/jveteriner.2019.20.2.187.
17. Noor SM, Poeloengan M. 2004. Pemakaian antibiotik pada ternak dan dampaknya pada kesehatan manusia. Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
18. Palupi MF, Nugraha E, Hakim M, Atikah N. 2020. Evaluasi nilai konsentarsi hambat minimum siprofloksasin terhadap isolat *E. coli* dari usap kloaka broiler. *Prosiding*

- Penyidikan Penyakit Hewan Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah (Ratekpil) dan Surveilans Kesehatan Hewan Tahun 2020.* Hal: 414-422
19. Putten BCL, Remondini D, Pasquini G, Janes VA, Matamoros S and Schultsz C. 2019. Quantifying the contribution of four resistance mechanisms to ciprofloxacin MIC in *Escherichia coli* : a systematic review. *Antimicrob Chemother* 74: 298–310. doi:10.1093/jac/dky417.
  20. Rahayu WP, Nurjanah S, dan Komalasari S. 2018. *Escherichia coli* : Patogenitas, Analisis dan Kajian Risiko. IPB Press. Bogor.
  21. Siahaan S. 2015. Studi pengembangan kebijakan pengendalian resistansi antimikroba di Indonesia, disampaikan pada Diseminasi Hasil Kajian Studi Pengembangan Kebijakan Pengendalian Resistansi Antimikroba di Indonesia tanggal 23 April 2015.
  22. Sumambang A, Ariyanto AM, Kompudu A, Pangaribuan DM , Nugroho E, Puspita RM, Ulfa D. 2019. Persepsi Peternak Terhadap Penggunaan Antibiotik Pada Peternakan Ayam Pedaging Komersial Di Provinsi Kalimantan Barat. Prosiding Penyidikan Penyakit Hewan Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah (RATEKPIL) dan Surveilans Kesehatan Hewan.
  23. Tarmudji. 2003. Kolibasilosis Pada Ayam : Etiologi, Patologi dan Pengendaliannya. *Wartazoa* Vol. 13 No.2.
  24. Tyasningsih WY, Yurianti A, Rahmahani J, Setiawan B, Harijani N, Budiarto, Effendi MH, Salamah dan Witaningrum AM. 2021. *Poll Res.* 40 (1) : 317-321.
  25. [WHO] World Health Organization. 2019. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6<sup>th</sup> Revision 2018. World Health Organization.
  26. World Organisation for Animal Health (OIE). 2020. Terrestrial Animal Health Code. Harmonisation of national antimicrobial resistance surveillance and monitoring programmes. Chapter 6.8. <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access>.

## DETEKSI KONTAMINASI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* PADA VAKSIN VIRUS LIVE DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) KONVENSIONAL

Ernes Andesfha<sup>1</sup>, Joen Firmanta P<sup>1</sup>, Istiyaningsih<sup>1</sup>, Dina Kartini<sup>1</sup>, Sarji<sup>1</sup>, Meutia Hayati<sup>1</sup>, Deden Amijaya<sup>1</sup>, Neneng Atikah<sup>1</sup>, Citra Patrianegari<sup>1</sup>, Sri Arofah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unit Uji Bakteriologi, <sup>2</sup>Unit Supply Center  
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340  
email : ernasandesfha@gmail.com

### ABSTRAK

Vaksin merupakan bahan biologik yang memiliki peran penting dalam menjaga kesehatan hewan melalui mekanisme menstimulasi sistem imunitas untuk menghasilkan kekebalan. Perdagangan internasional dan perpindahan bahan biologik yang ditujukan penggunaannya dalam bidang veteriner harus tunduk pada aturan terkait pembatasan yaitu meminimalkan penyebaran agen patogen dari hewan dan manusia. Ketetapan dalam aturan ini salah satunya adalah produk akhir bahan biologik seperti vaksin harus bebas dari kontaminasi bakteri *Mycoplasma*, oleh karena itu penting dilakukan deteksi kontaminasi *Mycoplasma* pada bahan biologik yang digunakan dalam produksi vaksin, antara lain *master* dan *working seed* vaksin/bakter yang digunakan dan bahan yang berasal dari hewan seperti serum, tripsin, *master* dan *working* sel kultur. BBPMSOH rutin melakukan deteksi kontaminasi *Mycoplasma* pada sampel vaksin virus *live* menggunakan metode kultur pada media spesifik *Mycoplasma* namun membutuhkan waktu lama yaitu 4 minggu 10 hari. Pengembangan metode deteksi kontaminasi *Mycoplasma* diharapkan dapat mempercepat waktu pengujian, metode yang lebih sensitif dan akurat dengan menggunakan metode *Polymerase chain reaction* (PCR) konvensional. Sebanyak 26 sampel vaksin virus *live* bentuk kering beku diambil dari distributor perusahaan obat hewan di 5 Provinsi yaitu Sumatera Barat, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur dan Bali. Sampel vaksin terdiri dari 9 vaksin *ILT live* dan 17 sampel vaksin *ND live*. Hasil uji deteksi kontaminasi *M. gallisepticum* didapatkan 100% sampel vaksin negatif kontaminasi *M. gallisepticum*, hal ini terlihat pada hasil elektroforesis yang tidak menunjukkan pita ampikon. Kontrol negatif menunjukkan hasil negatif dan kontrol positif *M. gallisepticum* strain S6 menunjukkan hasil positif pada panjang ampikon 723 bp. Vaksin yang mengandung kontaminan *Mycoplasma* dapat memberikan dampak pada penyebaran agen patogen sehingga dapat menginfeksi hewan dan mempengaruhi pembentukan kekebalan karena hewan tidak hanya terintroduksi agen dalam vaksin namun terpapar kontaminan dalam vaksin. Deteksi kontaminasi *Mycoplasma* dengan metode PCR ini berhasil memberikan sensitifitas dan kecepatan waktu pengujian sehingga bisa menjadi metode pengembangan baru dalam deteksi kontaminasi *Mycoplasma* di BBPMSOH.

**Keywords:** deteksi, metode, *Mycoplasma*, kontaminasi, vaksin.

### ABSTRACT

Vaccines are biological materials that have an important role in maintaining animal health through the mechanism of stimulating the immune system to produce immunity. International trade and movement of biological materials intended for use in the veterinary field must be subjected to restrictions related to minimizing the spread of pathogenic agents from animals and humans. One of the provisions in this regulation is that the final product of biological materials such as vaccines must be free from contamination with *Mycoplasma* bacteria, therefore it is important to detect *Mycoplasma* contamination on biological materials used in vaccine production, including master and working seeds of vaccines/bacteria used and materials used derived from animals such as serum, trypsin, master and working cell cultures. NVDAL routinely detects *Mycoplasma* contamination in live virus vaccine samples using the culture method on *Mycoplasma* specific media but takes a long time of 4 weeks 10 days. The development of the *Mycoplasma* contamination detection method is expected to speed up the testing time, a more sensitive and accurate method using the conventional polymerase chain reaction (PCR) method. A total of 26 samples of freeze-dried live virus vaccine were taken from distributors of veterinary drug companies in 5 provinces, namely West Sumatra, West Java, Central Java, East Java and Bali. The vaccine samples consisted of 9 live *ILT* vaccines and 17 live *ND* vaccine samples. The results of the *M. gallisepticum* contamination detection test showed that 100% of the vaccine samples were negative for *M. gallisepticum* contamination, this was seen in the electrophoresis results which did not show amplicon bands. Negative control showed negative results

and positive control of *M. gallisepticum* strain S6 showed positive results at 723 bp amplicon length. Vaccines containing *Mycoplasma* contaminants can have an impact on the spread of pathogenic agents so that they can infect animals and affect the formation of immunity because animals are not only introduced to agents in the vaccine but are exposed to contaminants in the vaccine. Detection of *Mycoplasma* contamination with the PCR method has succeeded in providing sensitivity and speed of testing time so that it can be a new development method in the detection of *Mycoplasma* contamination in NVDAL.

**Keywords:** detection, method, *Mycoplasma*, contamination, vaccine.

## PENDAHULUAN

*Mycoplasma* adalah bakteri yang memiliki karakter khas yaitu tidak memiliki dinding sel, sehingga menyebabkan bakteri ini tahan terhadap antibiotik yang mekanisme kerjanya merusak dinding sel. Bakteri *Mycoplasma* dapat menginfeksi manusia, hewan dan juga mengkontaminasi produk biologik. Produk biologik adalah media hidup untuk memperbanyak mikroorganisme, termasuk juga bahan yang dihasilkan dari hewan serta mikroorganisme yang akan diperbanyak untuk menghasilkan produk akhir antara lain vaksin. Semua produk biologik yang digunakan dalam menghasilkan vaksin serta produk akhirnya harus dipastikan bebas dari kontaminasi *Mycoplasma* <sup>(13)</sup>.

Ketetapan Office International des Epizooties (OIE) dalam perdagangan internasional terkait materi biologik untuk menggunakan di bidang veteriner harus tunduk pada aturan yang bertujuan untuk meminimalkan penyebaran agen patogen dari hewan dan manusia. Suatu negara dapat memberlakukan persyaratan untuk pengujian bukti tidak adanya agen patogen sebelum mengizinkan impor yang diatur dari bahan turunan hewan dan zat yang mengandung turunan tersebut <sup>(9)</sup>.

Bakteri *Mycoplasma* dapat mengkontaminasi produk biologik melalui sel kultur dan produk biologik yang berasal dari telur, *starting material* seperti *master* dan *working seeds*, *master* dan *working*

sel dan bahan tambahan yang berasal dari hewan (serum), kontaminasi juga dapat terjadi dalam proses pasase materi biologik dan dalam proses pembuatan produk akhir <sup>(13)</sup>. Kontaminasi *Mycoplasma* secara visual tidak menyebabkan kekeruhan, tetapi dapat menurunkan tingkat pertumbuhan sel kultur sehingga kualitas produksi vaksin dapat terpengaruh. Hal ini tentu akan menimbulkan masalah dalam jaminan konsistensi kualitas produksi dan keamanan vaksin <sup>(7)</sup>, oleh karena itu keberadaan kontaminan *Mycoplasma* harus mampu dideteksi dengan metode yang akurat.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) telah rutin melakukan uji deteksi kontaminasi *Mycoplasma* pada produk vaksin virus *live* menggunakan metode kultur dalam media *Pleuropneumonia Like Organisms* (PPLO) broth dan PPLO agar. Namun, metode ini membutuhkan waktu yang lama yaitu 4 minggu 10 hari karena dibutuhkan pasase berulang pada media PPLO broth dan kultur terakhir di media PPLO agar<sup>(3)</sup>. Tujuan kajian ini melakukan pengembangan metode tahap awal untuk deteksi kontaminasi *Mycoplasma* dengan menggunakan metode PCR konvensional, sehingga diharapkan dapat mempercepat waktu pengujian dan meningkatkan sensitifitas metode uji.

## METODE

### Waktu, Tempat dan Lingkup Pengkajian

Kegiatan pengkajian ini terbagi dalam dua tahap yaitu tahap pengambilan sampel vaksin virus *live* yaitu di lima provinsi di Indonesia, yang



dilaksanakan tanggal 23 Februari - 24 Maret 2021 dan tahap pengujian deteksi kontaminasi *Mycoplasma* menggunakan metode PCR dilaksanakan pada bulan Juni 2021. Tahap pengujian meliputi ekstraksi sampel vaksin, uji PCR yang meliputi tahap master mix reagent PCR, tahap thermocycler (amplifikasi DNA) dan visualisasi DNA melalui tahap elektroforesis.

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada pengkajian adalah isolat *Mycoplasma gallisepticum* strain S6, *Destillated water* steril, Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany), Kit *GoTaq® Green Master Mix Kit* (PROMEGA, USA), *Agarose Gel*, *SYBR Safe DNA Gel Stain*, *DNA Ladders 100 bp*, *Loading dye*, dan *TAE Buffer 10X*.

Alat-alat yang digunakan antara lain tabung reaksi, *Erlenmeyer*, gelas ukur, autoklaf, pipet 1 mL dan 10 mL, tabung mikrotube 200 µL, mikropipet dan tips volume 10 µL, 100 µL, 1000 µL, *dry block thermostat*, *bench hood*, mikrospin, mikrosentrifuse, *ice plate*, vortex, microwave, cetakan *agarose* dan *comb*, mesin PCR *thermal cycler* (ABI Veriti, Applied Biosystems, USA), peralatan elektroforesis dan peralatan *gel documentation system* (FireReader V10, Cleaver Scientific, UK).

### Sampel Pengkajian

Sampel vaksin virus diambil dari distributor milik perusahaan obat hewan di lima Provinsi yaitu Sumatera Barat, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur dan Bali. Sampel yang diambil berupa vaksin virus *live* dalam bentuk kering beku. Terdapat sembilan sampel vaksin ILT *live* dan tujuh belas sampel vaksin ND *live*.

### Ekstraksi Vaksin Virus Live

Vaksin virus diekstraksi menggunakan *Qiamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Germany), dan metode ekstraksi sesuai dengan protokol ekstraksi manual kit. Secara singkat tahap ekstraksi untuk masing-masing sampel adalah

sebagai berikut: proteinase K sebanyak 20 µL dimasukkan ke dalam tube volume 1.5 mL dan ditambahkan 200 µL sampel vaksin yang telah diencerkan dengan 10 mL *distillated water*, selanjutnya ditambahkan 200 µL buffer AL dan dihomogenkan dengan cara *divortex* dan diinkubasi di *dry block thermostat* suhu 56°C selama sepuluh menit. Tahap berikutnya ditambahkan *ethanol absolut* sebanyak 200 µL dan dihomogenkan dengan cara *divortex* selama lima belas detik dan *dispin down* untuk menghilangkan sisa-sisa campuran yang terdapat dalam tutup tube.

Semua campuran sampel dipindahkan ke dalam *mini spin column* yang dilengkapi tabung penampung dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit. Tabung penampung dan isinya dibuang sedangkan *mini spin* dipindahkan ke tabung penampung baru dan ditambahkan buffer AW1, selanjutnya disentrifus pada kecepatan 8000 rpm selama satu menit. Tabung penampung dan isinya dibuang dan *mini spin* dipindahkan ke tabung penampung baru, selanjutnya ditambahkan buffer AW2 dan disentrifuse pada kecepatan 14000 rpm selama tiga menit. *Mini spin column* dipindahkan ke tabung penampung baru dan ditambahkan buffer AE sebanyak 200 µL atau jika mau lebih konsentrat dapat ditambahkan 50 µL, kemudian diinkubasi di suhu ruang selama satu menit, setelah itu disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit. Cairan yang terdapat dalam tabung penampung merupakan sampel vaksin yang akan dideteksi adanya kontaminasi bakteri *Mycoplasma gallisepticum*.

### Deteksi Kontaminasi Bakteri *Mycoplasma gallisepticum*

Deteksi kontaminasi *Mycoplasma gallisepticum* dalam sampel vaksin virus *live* menggunakan metode PCR *simplex* dengan panjang ampikon 723 bp. Komposisi reagen

*master mix* PCR menggunakan *GoTaq® Green Master Mix Kit* dengan volume total 19µl yang terdiri dari 9.375µl *GoTaq® Green master mix*, 0.75µl primer *forward* (10µM) 5'-GGATCCCATCTCGACCACGACAAA3', dan 0.75 µl primer *reverse* (10µM) 5'-CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA-3'<sup>(8)</sup>, 4.125µl dH<sub>2</sub>O dan 4µl DNA *template*. Proses PCR dilakukan dengan siklus pre denaturasi 95°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 54°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Pembacaan hasil PCR melalui tahap elektroforesis menggunakan *agarose gel* 1.5%, pewarnaan *SYBR safe* dan marker 100bp menggunakan mesin *gel documentation system*. Hasil positif adanya kontaminasi bakteri *Mycoplasma gallisepticum* ditunjukkan dengan munculnya pita dengan panjang ampikon 723 bp.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

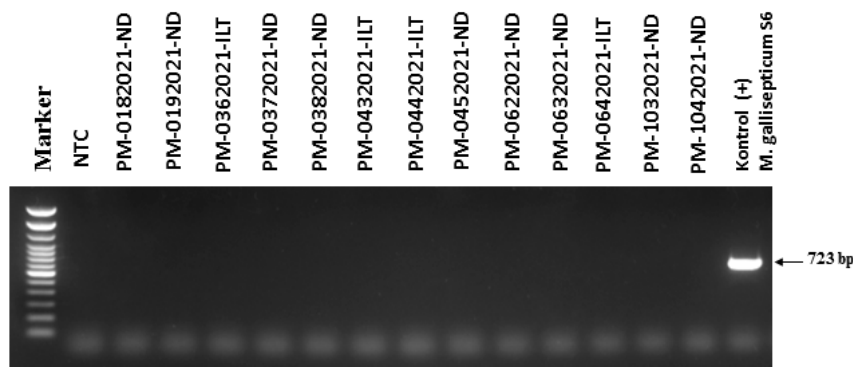
Sebanyak 26 sampel vaksin virus *live* diuji kontaminasi *M. gallisepticum* dengan menggunakan metode PCR dan hasilnya 100% sampel vaksin tidak terdapat kontaminasi bakteri *M. gallisepticum*, hal ini terlihat pada hasil elektroforesis yang tidak menunjukkan pita ampikon pada Gambar 1 dan 2. *Non template control* (NTC) atau kontrol negatif menunjukkan hasil negatif, sedangkan kontrol positif yaitu bakteri *M. gallisepticum* strain S6 menunjukkan hasil positif pada ampikon 723 bp.

*Mycoplasma* merupakan salah satu bakteri terkecil, yang tidak memiliki struktur dinding sel, mampu melewati filter dengan ukuran pori 0.2 mikron, tumbuh secara aerobik atau dalam kondisi anaerobik fakultatif<sup>(14)</sup>. Aspek regulasi pengujian *Mycoplasma* untuk bahan biologik dilatar belakangi oleh kejadian pada tahun 1950-an dan 1960-an, yaitu ditemukan banyak kultur sel dan sel lestari yang terkontaminasi oleh

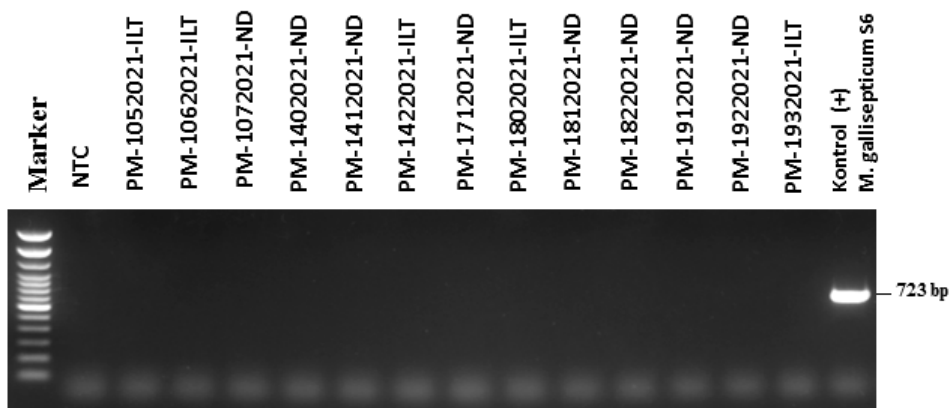
*Mycoplasma*. Hal ini menimbulkan kekhawatiran akan keamanan vaksin yang diproduksi dalam sel<sup>(11)</sup>, sehingga menjadi persyaratan untuk pengujian *Mycoplasma* terhadap substrat sel yang digunakan serta produk biologik yang diproduksi dari substrat sel<sup>(14)</sup>.

Bakteri *Mycoplasma* banyak yang bersifat komensal pada berbagai macam tanaman, serangga, reptil, burung, mamalia, dan inang manusia, namun terdapat sejumlah spesies *Mycoplasma* bersifat patogen dan menyebabkan penyakit pada inang alami mereka, khususnya spesies dari genus *Mycoplasma* dan *Acholeplasma*, yang sering juga mengkontaminasi substrat vaksin<sup>(11)</sup>. Selain kekhawatiran adanya agen infeksius lain yang mengkontaminasi vaksin yang dapat ditularkan ke penerima vaksin. Terdapat kajian yang menunjukkan bakteri *Mycoplasma* di dalam kultur sel dapat berinteraksi dengan sel inang dan dapat mengubah banyak reaksi metabolisme dan biokimia sel, seperti fungsi sel, morfologi, penyimpangan kromosom, penurunan atau peningkatan hasil virus, dan produksi sitokin<sup>(11)</sup>, dengan demikian dampak adanya kontaminasi *Mycoplasma* dapat mempengaruhi hampir setiap parameter, fungsi, dan aktivitas sel yang dikultur<sup>(12, 11)</sup>.

Beberapa strain *Mycoplasma* yang sering mengkontaminasi bahan biologik adalah *Acholeplasma laidlawii* mengkontaminasi kultur sel yang umum berasal dari hewan dan lingkungan. *Mycoplasma hyorhinis* umumnya mengkontaminasi kultur sel yang berasal dari hewan dan mamalia patogen. *Mycoplasma orale* adalah bakteri sensitif antibiotik dan umumnya mengkontaminasi kultur sel yang berasal dari manusia. *M. synoviae* dan *M. gallisepticum* merupakan patogen yang banyak menginfeksi unggas dan *M. synoviae* umumnya mengkontaminasi kultur sel yang berasal dari unggas<sup>(13)</sup>.



Gambar 1 Hasil elektroforesis deteksi kontaminasi bakteri *M. gallisepticum* dari 13 vaksin virus *live* yang terdiri dari 9 vaksin ND, 4 vaksin ILT menunjukkan hasil negatif kontaminasi *M. gallisepticum*. NTC (*non template control*) atau kontrol negatif hasilnya negatif dan kontrol positif yaitu bakteri *M. gallisepticum* strain S6 hasilnya positif pada panjang amplicon 723 bp.



Gambar 2 Hasil elektroforesis deteksi kontaminasi bakteri *M. gallisepticum* dari 13 vaksin virus *live* yang terdiri dari 8 vaksin ND, 5 vaksin ILT menunjukkan hasil negatif kontaminasi *M. gallisepticum*. NTC (*non template control*) atau kontrol negatif hasilnya negatif dan kontrol positif yaitu bakteri *M. gallisepticum* strain S6 hasilnya positif pada panjang amplicon 723 bp.

Vaksin adalah suatu bahan yang memiliki sifat antigenik yang disuntikkan pada manusia/ hewan sehat untuk menstimulasi sistem kekebalannya sehingga dihasilkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit, hal ini bertujuan untuk mencegah atau mengurangi pengaruh infeksi oleh virus, bakteri atau toksin. Bahan utama pembuatan vaksin adalah mikroorganisme yang akan dibuat menjadi vaksin yang dapat berupa virus atau bakteri yang dilemahkan atau dimatikan, vaksin juga dapat berupa hasil pemurnian mikroorganisme berupa protein, peptida, partikel menyerupai virus <sup>(10)</sup>.

Vaksinasi menjadi salah satu program yang penting untuk mewujudkan kesehatan hewan, begitu pentingnya vaksin dalam menjaga kesehatan hewan maka dibutuhkan vaksin yang memiliki mutu yang baik karena tujuan pemberian vaksin adalah menstimulasi reaksi kekebalan tanpa menimbulkan penyakit. Produk vaksin harus memenuhi standar kualitas dalam proses produksi di pabrik dan memenuhi standar uji mutu dalam proses registrasi yaitu harus steril, tidak ada kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *E. coli*, jamur dan jasad renik, vaksin harus aman dan memiliki potensi yang tinggi dalam menstimulasi pembentukan kekebalan <sup>(3)</sup>.

*International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH)* merupakan suatu Pedoman Kerjasama Internasional tentang Harmonisasi Persyaratan Teknis Pendaftaran Produk Obat Hewan untuk memfasilitasi harmonisasi perizinan produk baru di bidang veteriner. Pedoman VICH menekankan bahwa produk biologik untuk penggunaan di bidang veteriner harus bebas dari kontaminasi *Mycoplasma*, hal ini penting untuk menjamin konsistensi produksi dan keamanan produk akhir biologik. Kontaminan *Mycoplasma* dapat masuk ke dalam kultur sel dan produk biologik asal telur melalui *master seeds*, *master* dan *working* sel kultur, bahan awal yang berasal dari hewan, dan dalam proses pasase/perbanyak bahan biologik dan proses produksi vaksin (mixing, inaktivasi, pengemasan), sehingga bahan dan produk biologik tersebut harus diuji deteksi kontaminasi *Mycoplasma* <sup>(13)</sup>.

Regulasi VICH dalam mendeteksi kontaminasi *Mycoplasma* melalui dua metode yaitu kultur pada media spesifik *Mycoplasma* dan pewarnaan *berfluorescent* yang terikat pada DNA *Mycoplasma* yang terdapat dalam kultur sel <sup>(13)</sup>. OIE menetapkan beberapa metode deteksi kontaminan *Mycoplasma* melalui kultur pada media spesifik *Mycoplasma*, perwarnaan DNA dan uji PCR<sup>(9)</sup>.

BBPMSOH telah rutin melakukan uji deteksi kontaminasi *Mycoplasma* terutama pada produk vaksin virus *live* yang diproduksi dari unggas dengan menggunakan media *Mycoplasma* yaitu PPLO *broth* dan PPLO agar. Sebanyak empat vaksin sediaan vakum kering beku diuji, setiap dua kemasan dilarutkan ke dalam satu wadah pelarut steril, dicampur sampai homogen. Masing-masing vaksin yang telah dilarutkan diambil 1 mL dan diinokulasi ke dalam 20 mL media PPLO *broth*, kontrol positif *Mycoplasma gallisepticum* strain S6 dan kontrol

negatif berupa *distillated water* (DW) steril diambil @ 1 mL dan diinokulasi ke dalam 20 mL media PPLO *broth* dan diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Biakan vaksin, kontrol positif dan kontrol negatif dalam PPLO *broth* dipasase (diinokulasikan) kembali 1 mL ke dalam 10 mL media PPLO *broth*, pasase dilakukan dengan cara yang sama sebanyak 3 kali dengan interval 7 hari. Pada pasase terakhir diambil 0.1 mL dan diinokulasikan pada media PPLO agar dan diinkubasikan pada 37°C 5% CO<sub>2</sub> selama 10 hari <sup>(3)</sup>.

Vaksin yang terkontaminasi *Mycoplasma* pada media PPLO *broth* akan menyebabkan perubahan warna media PPLO *broth* dari warna merah menjadi warna orange sampai kuning <sup>(3)</sup>. Hal ini disebabkan karena bakteri *Mycoplasma* mampu memfermentasi glukosa dalam media PPLO sehingga membuat pH media menjadi asam, kondisi media yang asam ini mampu mengubah indikator warna *phenol red* menjadi kuning, sehingga menyebabkan perubahan warna media PPLO berubah dari warna merah menjadi kuning. Berdasarkan teknik deteksi kontaminasi menggunakan metode kultur pada media PPLO tersebut membutuhkan waktu yang lama, yaitu 4 minggu 10 hari. Metode kultur ini umumnya juga digunakan di perusahaan produksi produk biologik, namun penggunaan metode ini menjadi kurang memungkinkan karena pada tahap panen selama proses produksi bahan biologik dibutuhkan waktu pengujian yang cepat untuk membuat keputusan yang tepat <sup>(14)</sup>.

Metode kultur pada media *Mycoplasma* yang membutuhkan waktu yang lama menjadi dasar untuk BBPMSOH mengembangkan metode baru dalam deteksi kontaminasi *Mycoplasma* dengan menggunakan metode PCR, metode ini yang merupakan salah satu metode yang direkomendasikan OIE. Pengembangan metode yang digunakan adalah metode PCR konvensional, jika

terdapat kontaminan maka visualisasi DNA *Mycoplasma* akan terlihat pada media agarose berupa pita amplikon yang berpendar dengan panjang sesuai dengan primer dan target gen yang digunakan. Pengembangan metode ini berhasil mempercepat waktu pengujian deteksi kontaminan *Mycoplasma* yang signifikan yaitu dari 4 minggu 10 hari menjadi 2 hari.

Metode uji berbasis reaksi berantai polimerase (PCR) dapat memberikan kemampuan untuk mendeteksi kontaminan, yang mungkin tidak berhasil diperbanyak dalam metode kultur pada media. Deteksi kontaminan *Mycoplasma* dapat juga dilakukan menggunakan metode PCR realtime yang lebih cepat, sangat terkontrol, dan hasil dapat dilihat secara realtime menggunakan Kit MycoSEQ dari Life Technologies. Kemampuan deteksi metode ini dapat diperluas dengan mendesain primer dan probe secara spesifik untuk suatu *family* agen<sup>(9)</sup>.

Kedua metode PCR konvensional dan PCR realtime fokus pada batas deteksi yaitu jumlah salinan DNA genom *Mycoplasma* terendah yang dapat ditemukan dalam sampel. Sebaliknya, batas deteksi metode berbasis kultur pada media yang tumbuh secara lambat dan biasanya tergantung pada jumlah *coloni forming unit/unit* pembentuk koloni (CFU) yang dihasilkan pada permukaan media padat. Metode PCR juga dapat digunakan untuk sampel yang hanya tersedia dalam jumlah sedikit, tetapi memiliki umur simpan yang pendek dan untuk konfirmasi jika hasil kultur awal meragukan<sup>(6)</sup>.

Kontaminan *Mycoplasma* yang tidak dapat tumbuh dalam media *broth* dan agar yang dikultur secara konvensional, direkomendasikan untuk uji di kultur jaringan dengan metode kultur sel indikator<sup>(2)</sup>. Metode deteksi kontaminasi *Mycoplasma* kultur sel indikator/ pewarnaan DNA menggunakan pewarna *berfluorescent* yang akan terikat pada DNA *Mycoplasma* dapat dilakukan sebagai upaya mengatasi

kendala waktu yang lama untuk kultur pada media. Sampel dikultur pada sel Vero selama 6-8 hari, kemudian diwarnai dengan pewarna *fluoresen Hoechst 33258*, yang mengikat secara khusus pada DNA. Pewarnaan ini akan memudahkan mendeteksi *Mycoplasma*, kultur sel yang terkontaminasi setelah diwarnai akan terlihat sangat khas berupa pola fluoresensi bentuk filamen yang khas pada permukaan sel. Pada kontaminasi *Mycoplasma* sangat berat, bentukan filamen juga akan ditemukan di daerah sekitar sel kultur. Metode ini mampu mendeteksi *Mycoplasma* dengan konsentrasi 100 CFU/ml. Metode pewarnaan DNA ini merupakan metode yang mampu mendeteksi *Mycoplasma* yang tidak dapat dikultur karena kesulitan dalam menumbuhkan di media uji<sup>(7)</sup>.

VICH menetapkan untuk bahan biologik seperti *master seed* virus/bakteri dan master sel dapat dideteksi kontaminasi *Mycoplasma* menggunakan teknik kultur pada media *Mycoplasma* dan pewarnaan DNA, untuk komponen bahan asal hewan dideteksi dengan kultur pada media *Mycoplasma*. Sedangkan hasil panen vaksin dan produk akhir vaksin diuji menggunakan media *broth* dan agar spesifik untuk *Mycoplasma* dengan ketentuan pengujian dilakukan sesuai dengan kebijakan produksi vaksin<sup>(13)</sup>. Ketentuan OIE menyatakan bahwa bahan biologis yang tidak dapat disterilkan sebelum atau selama digunakan dalam produksi vaksin, seperti bahan yang berasal dari hewan, misalnya serum dan tripsin, master dan working sel kultur, stok master *seed* virus atau bakteri harus diuji terhadap keberadaan mikroorganisme lain sebelum digunakan<sup>(9)</sup>.

Kojima *et al.* pada tahun 1996 pernah melakukan kajian deteksi kontaminasi bakteri *Mycoplasma* pada produk vaksin virus *live* untuk hewan sebanyak 61 sampel menggunakan metode uji kultur ke dalam media *Mycoplasma* dan selanjutnya diuji PCR dua tahap/*nested*. Hasilnya pada teknik kultur

di media *Mycoplasma* tidak terdeteksi adanya *Mycoplasma*, hal ini ditandai dengan tidak ada perubahan warna media *Mycoplasma*. Hasil deteksi menggunakan metode nested PCR didapatkan 36.1% (22/61) terdapat kontaminasi *Mycoplasma*, kontaminasi terbanyak pada vaksin aktif untuk babi sebanyak 68% (17/25), vaksin untuk sapi 13.6% (3/22) dan vaksin untuk anjing 50% (2/4) <sup>(5)</sup>.

Menurut Kojima *et al.* walaupun hasil PCR menunjukkan rekasi positif, tapi tidak selalu menunjukkan keberadaan kontaminasi *Mycoplasma* yang hidup dalam proses pembuatan vaksin. Karena secara umum, metode PCR dapat mendeteksi keberadaan *Mycoplasma* yang hidup dan *Mycoplasma* yang telah inaktif/mati sehingga kelemahannya tidak mampu membedakan *Mycoplasma* hidup dan mati. Keberadaan sumber kontaminan *Mycoplasma* tidak dapat diketahui karena yang diuji merupakan produk akhir yang berupa vaksin, namun dugaan kontaminan berasal dari bahan pembuat vaksin dan proses produksi vaksin <sup>(5)</sup>.

Hasil negatif dari metode kultur secara langsung dalam deteksi kontaminasi kemungkinan dapat disebabkan karena *Mycoplasma* kontaminan tidak dapat tumbuh di media yang digunakan, sebab terdapat beberapa jenis *Mycoplasma* yang membutuhkan spesifik zat tambahan untuk nutrisi hidupnya. Penambahan beberapa antibiotik yang termasuk dalam suatu vaksin sebagai pengawet mungkin juga dapat menghambat pertumbuhan *Mycoplasma* kontaminan. Beberapa tahapan dalam proses pembuatan vaksin juga dapat menyebabkan *Mycoplasma* kontaminan telah inaktif atau rusak sehingga saat dikultur tidak tumbuh. Keberadaan kontaminan *Mycoplasma* terlihat seperti tidak menunjukkan masalah dalam hal keamanan dan efikasi vaksin pada hewan. Namun hal yang penting adalah keberadaan vaksin terkontaminasi dengan

*Mycoplasma* patogen yang hidup akan menjadi masalah besar bagi usaha industri unggas untuk mengidentifikasi bakteri *Mycoplasma* dari flock peternakan <sup>(5)</sup>.

Berikut ini beberapa langkah yang dapat dilakukan untuk meminimalkan kontaminasi pada bahan biologik: 1). Memastikan sumber bahan dasar terbukti bebas kontaminasi dan ditangani secara aseptis. 2). Bahan yang tidak bisa disterilkan seperti master atau working seed virus/bakteri, master atau *working* sel kultur, *bovine* serum albumin harus ditangani secara aseptis dan diperlukan pengujian untuk membuktikan bebas kontaminan pada tahap produksi. 3). Bahan-bahan yang dapat disterilisasi tanpa mempengaruhi aktivitas biologisnya harus disterilkan dengan metode yang efektif untuk patogen yang bersangkutan. Hasil sterilisasi harus divalidasi untuk menunjukkan bahwa proses tersebut sesuai dengan tujuan dan menggunakan kontrol dalam setiap proses sterilisasi untuk memantau efisiensi. 4). Lingkungan tempat setiap penanganan aseptik dilakukan harus dijaga dalam keadaan bersih, terlindung dari sumber kontaminasi eksternal dan dikendalikan untuk mencegah kontaminasi internal <sup>(9)</sup>.

Beberapa data dari proses evaluasi efisiensi inaktivasi *Mycoplasma* pada setiap langkah pembuatan vaksin yang berpotensi untuk menonaktifkan *Mycoplasma* antara lain dengan melakukan inaktivasi pada suhu tinggi, paparan bahan kimia yang bersifat *Mycoplasmasidal*, atau menghilangkan *Mycoplasma* melalui ultrasentrifugasi, ultra-filtrasi, pemurnian kromatografi<sup>(14)</sup>. Suatu kajian penggunaan beta-propiolactone (BPL) dan formaldehida untuk inaktivasi *Mycoplasma* menunjukkan semua 22 *Mycoplasma* yang diuji dapat sepenuhnya dinonaktifkan dalam waktu 3-24 jam pada suhu kamar dalam cairan alantois pada 0,2% ( $\geq 66,60$  mM) formaldehida dan 0,1% ( $\geq 13,87$  mM) BPL<sup>(6)</sup>.

Penggunaan telur ayam berembrio dan kultur sel primer dari embrio ayam untuk pembuatan vaksin berbasis telur menimbulkan risiko potensial kontaminasi *Mycoplasma* karena distribusi yang luas dan transmisi vertikal dan horizontal. Sehingga perlu dilakukan monitoring *Mycoplasma* dari flock SPF dan telur SPF dengan mendeteksi dua patogen utama yaitu *M. synoviae* dan *M. gallisepticum*. Status flock SPF dapat dipertahankan dengan cara melakukan uji kultur dan serologi yang sistematis dari flock untuk memastikan tidak adanya agen infeksi virus dan bakteri unggas tertentu yang dapat ditularkan secara horizontal dan vertikal <sup>(1)</sup>.

Hasil pengembangan metode deteksi kontaminasi *Mycoplasma* ini meskipun dapat mempercepat waktu pengujian, tetapi masih memiliki kelemahan yaitu metode PCR konvensional tidak dapat membedakan secara akurat antara kontaminan *Mycoplasma* yang hidup dan yang mati, sehingga dapat menyebabkan hasil positif palsu <sup>(2)</sup>. Uji deteksi kontaminasi *Mycoplasma* yang berikutnya akan dikembangkan adalah uji menggunakan metode PCR real time (qPCR). Metode PCR *Real time* dapat dilakukan perhitungan secara akurat jumlah *Mycoplasma* yang ditemukan, disamping itu waktu pengujian yang signifikan cepat karena hasilnya dapat dilihat secara realtime, serta sensitivitas yang lebih besar dibandingkan PCR konvensional. Menurut Lovatt <sup>(7)</sup>, teknik qPCR dapat divalidasi sebagai alternatif untuk uji pelepasan batch vaksin serta untuk proses kontrol dan tujuan validasi bahan baku. Melalui metode PCR realtime ini dapat dibandingkan hasil qPCR sebelum dan sesudah pengayaan sehingga memungkinkan membedakan antara *Mycoplasma* hidup dan mati. Hal ini dapat menjadi solusi atas kelemahan metode PCR konvensional yang tidak bisa membedakan *Mycoplasma* hidup atau mati <sup>(7)</sup>. Namun perlu diperhatikan bahwa metode

uji berbasis molekular ini harus tervalidasi dan dirancang sesuai dengan tujuan jika tidak dapat terjadi kesalahan deteksi atau kurang sensitif untuk mendeteksi keberadaan kontaminan<sup>(4)</sup>.

## KESIMPULAN

Uji deteksi kontaminasi *M. gallisepticum* dari sampel vaksin virus *live* didapatkan hasil 100% sampel vaksin negatif kontaminasi *M. gallisepticum*, kontrol negatif dan kontrol positif sebagai kontrol kualitas pengujian menunjukkan kontrol negatif hasilnya negatif dan kontrol positif *M. gallisepticum* strain S6 menunjukkan hasil positif pada panjang ampikon 723 bp. Deteksi kontaminan pada produk biologik menjadi sangat penting untuk mencegah penyebaran agen patogen dan mengoptimalkan potensi vaksin dalam memproduksi kekebalan tubuh. Melalui kajian ini pengembangan awal metode uji deteksi kontaminasi *Mycoplasma* dengan metode PCR konvensional berhasil memberikan sensitivitas dan waktu pengujian yang lebih cepat sehingga pengembangan metode ini dapat digunakan oleh BBPMSOH untuk mendeteksi kontaminasi *Mycoplasma* pada sampel vaksin, terutama sampel vaksin virus dan bakteri yang *live*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. European Pharmacopoeia. 2010. Chapter 6.6.: 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. 5137-5139.
2. FDA-Food and Drug Administration. 2006. Draft Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases. Bethesda.. [internet]. [diunduh 2021 Juni 20]. Tersedia pada : <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm074801.htm>.
3. FOHI-Farmakope Obat Hewan Indonesia. 2018. Jilid I (Sediaan Biologik). Edisi 5. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan

- tan Hewan. Kementerian Pertanian.
4. Hodinka RL. 2013. Point: is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory? *J. Clin. Microbiol.*, 51, 2–4.
  5. Kojima A, Takahashi T, Kijima M, et al. Detection of Mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Biologicals*. 1997;25:365-71.
  6. Koski TA, Christianson GG, Cole FL. 1976. Inactivation of Mycoplasmas by use of phenol, formalin and betapropiolactone. *J Biol Stand*. 4(2):151-154.
  7. Lovatt A. 2015. Detection of Mycoplasma in biopharmaceutical vaccines and gene cell therapies. [internet]. [diunduh 2021 Mei 20]. Tersedia pada : <https://www.sgs.com/en/news/2015/12/detection-of-Mycoplasma-in-biopharmaceuticals-vaccines-and-gene-cell-therapies>.
  8. Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, Tait RC (1991) Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis* 35:62-69.
  9. OIE-World Organization for Animal Health. 2018. Terrestrial Manual 2018. Chapter 1.1.9. Test for sterility and freedom from contamination of biological material intended for veterinary use.
  10. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. 2013. *Vaccines : Different type of vaccines*. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia:Elsevier.
  11. Rottem S, Barile MF. Beware of Mycoplasmas. *Trends Biotechnol* 1993, 11(4):143-151.
  12. Razin S, Yogev D, Naot Y: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, 62(4):1094-1156.
  13. VICH-International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medical Products. 2014. Testing for The Detection of Mycoplasma Contamination. VICH GL34 (BIOLOGICALS : Mycoplasma. Bruxelles (Belgium).
  14. Volokhov DV, Chandler DKF, Chizhikov VE. 2010. Potential Mycoplasma Contaminants: Inactivation during Production of Inactivated Egg-Based Viral Vaccines. [internet]. [diunduh 2021 Mei 28]. Tersedia pada : <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/117498-Potential-Mycoplasma-Contaminants-Inactivation-during-Production-of-Inactivated-Egg-Based-Viral-Vaccines/>.



## IDENTIFIKASI MOLEKULER SAMPEL VAKSIN AVIAN INFLUENZA (AI) INAKTIF TAHUN 2019-2020 DENGAN METODE KONVENSIONAL REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (conRT-PCR)

\*Irma Rahayuningtyas<sup>1,2</sup>, Dina Kartini<sup>2</sup>, Dewi Astuti<sup>1</sup>, Sri Suryanti<sup>1</sup>, Ketut Karuni Nyanakumari Natih

1Unit Virologi 2 Unit Biotek  
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor , 16340

\*email : drh.irmahayuningtyas@gmail.com

### ABSTRAK

Pemerintah telah menetapkan vaksinasi sebagai salah satu strategi dalam penanggulangan wabah *Avian influenza* (AI) di Indonesia. Namun, virus AI mudah berevolusi sehingga pemerintah dan produsen vaksin secara berkala melakukan kajian ilmiah dan memperbaharui vaksin sesuai dengan kondisi lapang. Pengujian identitas terhadap komposisi antigen dalam vaksin AI dilakukan untuk memverifikasi strain virus AI yang digunakan dalam produk vaksin. Pengujian ini untuk memverifikasi identitas sampel vaksin AI inaktif tahun 2019-2020, baik sampel registrasi maupun dari kegiatan Pengkajian Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH). Uji identifikasi dilakukan terhadap 24 sampel dalam rangka registrasi Tahun 2019-2020 dan 18 sampel Pengkajian AI Tahun 2020. Tahap uji meliputi *pre-treatment* dengan *isopropyl myristate*, ekstraksi RNA, serta identifikasi gen Hemagglutinin (HA) menggunakan teknik *conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (conRT-PCR). Hasil pengujian identifikasi molekuler sampel vaksin AI registrasi tahun 2019-2020 menunjukkan keseluruhan antigen pada sampel vaksin yang diuji identik sehingga memenuhi persyaratan. Namun, pada sampel pengkajian AI tahun 2020 menunjukkan ada satu sampel tidak memenuhi persyaratan karena *seed* vaksin yang digunakan tidak identik dengan label. Pengujian identifikasi menggunakan metode conRT-PCR dipandang perlu untuk memverifikasi *seed* virus AI yang digunakan dalam sediaan vaksin AI inaktif *oil adjuvant* juga sebagai salah satu persyaratan yang harus dipenuhi dalam pengujian vaksin AI inaktif sesuai Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI).

**Kata kunci:** *Avian influenza*, RT-PCR, vaksin, H5N1, H9N2

### ABSTRACT

*The government has established vaccination as one of the strategic control measures for the Avian Influenza (AI) outbreak in Indonesia. However, AI viruses are easy to evolve, so the government and vaccine manufacturers regularly conduct scientific studies and update vaccines according to field conditions. Identity testing of the antigen composition in AI vaccines is carried out to verify the AI virus strains used in vaccine products. This test aims to verify the identity of the 2019-2020 inactivated AI vaccine samples, both registration and study samples of National Veterinary Drug Assay Laboratory (NVDAL). The identification test was carried out on 24 samples for the 2019-2020 registration period and 18 samples of the 2020 AI study. The test stages included pre-treatment with isopropyl myristate, RNA extraction, and the Hemagglutinin (HA) gene identification using conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction techniques (conRT-PCR). The results of the molecular identification test for AI vaccine samples registered for 2019-2020 show that all of the antigens in the tested vaccine samples are identical so that they meet the requirements. However, the 2020 AI study sample showed that one sample did not meet the requirements because the vaccine seed used was not identical to the label. Identification testing using the conRT-PCR method is necessary to verify the AI virus seeds used in the inactivated AI oil adjuvants vaccine. One of the requirements must be met in testing inactivated AI vaccines according to the Indonesian Pharmacopoeia of Veterinary Drugs (FOHI).*

**Keywords:** *Avian Influenza*, H5N1, H9N2, RT-PCR, vaccine

## PENDAHULUAN

Penyakit *Avian influenza* (AI) masih menjadi perhatian utama bagi dunia perunggasan di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh virus Influenza tipe A, yang termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*, genus *influenza virus*. Influenza tipe A ini mampu menginfeksi unggas dan mamalia, termasuk manusia. Data dari *World Health Organization* (WHO) menunjukkan bahwa dari bulan Januari 2003 hingga 8 Juli 2021, terdapat 862 kasus infeksi AI subtipe H5N1 pada manusia yang dilaporkan dari 17 negara dengan *Case Fatality Rate* (CFR) 53%<sup>(30)</sup>. Data dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan bahwa kasus AI pada manusia di Indonesia sejak tahun 2005–2018 terdapat 200 kasus dengan 168 kematian (CFR 84%) dan sejak tahun 2019–2020 belum dilaporkan adanya tambahan kasus<sup>(19)</sup>. Selain bersifat zoonosis, penyakit ini juga menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi di dunia perunggasan. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh penurunan produksi telur pada unggas petelur, maupun kematian yang tinggi akibat penyakit ini, mampu menghambat produktivitas dunia perunggasan di dalam negeri dan ekspor hasil peternakan. Menurut Ilham dan Yusdja (2010), penurunan jumlah unggas yang diusahakan pada peternakan yang terinfeksi (52,6%) merupakan dampak langsung akibat serangan wabah AI<sup>(17)</sup>. Sementara itu, secara tidak langsung penurunan juga terjadi pada peternakan yang tidak terinfeksi (50,3%), disebabkan karena ketakutan konsumen akan tertular yang menyebabkan permintaan terhadap daging dan telur unggas menurun.

Berdasarkan Keputusan Direktur Jenderal Bina Produksi Peternakan Nomor 17/Kpts/PD.640/F/02.04 tentang Pedoman Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasan Penyakit Hewan Menular Influenza pada Unggas (*Avian influenza*), pemerintah telah menetapkan

program vaksinasi sebagai salah satu strategi dalam penanggulangan wabah AI di Indonesia<sup>(8)</sup>. Strategi vaksinasi ini bertujuan untuk menginduksi kekebalan protektif pada populasi sasaran terhadap infeksi virus AI. Program vaksinasi yang baik dan dikombinasikan dengan penerapan biosekuriti yang efektif mampu mencegah introduksi dan penyebaran virus AI, sehingga mampu meminimalkan risiko kerugian ekonomi di peternakan, serta risiko penularan ke manusia<sup>(23)</sup>. Namun, virus AI memiliki karakteristik mudah berevolusi. Menurut Dharmayanti *et al.* (2012), kelompok virus AI dengan *antigenic drift* dapat muncul karena tekanan imunologis akibat vaksinasi sehingga kebijakan pemerintah dalam menanggulangi AI melalui vaksinasi harus berdasarkan pada kajian ilmiah<sup>(7)</sup>. Kemampuan virus AI dalam berevolusi ini menyebabkan pemerintah dan produsen vaksin selalu melakukan kajian ilmiah dan memperbaharui vaksin sesuai dengan kondisi lapang. Menurut Beato *et al.* (2010), protektivitas suatu vaksin dapat dipengaruhi oleh kesamaan antigenik antara *seed* virus vaksin dan virus lapang<sup>(4)</sup>.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) mempunyai tugas pokok dan fungsi melakukan pengujian mutu dan sertifikasi obat hewan, salah satunya yaitu pengujian vaksin AI. Vaksin AI yang akan diedarkan di Indonesia harus melalui serangkaian pengujian di BBPMSOH dan memenuhi persyaratan pengujian umum, identifikasi, inaktivasi, keamanan, dan potensi. Uji identifikasi vaksin AI secara molekuler dilakukan dengan teknik *conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (conRT-PCR) dan jika diperlukan maka dilanjutkan dengan analisis sekuen asam nukleat (*sequencing*). Metode RT-PCR ini mampu mengetahui identitas virus pada vaksin dengan cepat, sensitif, dan spesifik. Berdasarkan Farmakope Obat Hewan

Indonesia (FOHI) Biologik Jilid I Edisi 5 Tahun 2018, vaksin AI dinyatakan memenuhi syarat uji identifikasi apabila identik dengan strain virus vaksin tersebut <sup>(2)</sup>.

Tujuan dari kegiatan identifikasi molekuler vaksin AI inaktif dengan metode RT-PCR ini adalah untuk mengevaluasi pengujian identitas sampel vaksin AI inaktif tahun 2019-2020, baik sampel registrasi maupun sampel vaksin AI dari kegiatan Pengkajian Unit Uji Virologi. Uji ini dilakukan untuk mengetahui bahwa *seed* virus AI dalam vaksin identik dengan yang dinyatakan pada label dan dokumen atau tidak. Pengujian identitas ini dipandang perlu untuk menghilangkan kemungkinan bahwa vaksin yang diproduksi dan diedarkan telah terkontaminasi secara tidak sengaja selama proses produksi atau telah ditambahkan dengan strain lain tanpa izin. Hasil pengujian identitas secara molekuler terhadap sampel vaksin AI tahun 2019-2020 ini diharapkan mampu memberikan data kemurnian dan identitas vaksin AI yang diregistrasi maupun yang telah beredar di lapangan.

## METODE

### Waktu, Tempat dan Lingkup Pengujian

Pengujian identifikasi sampel vaksin AI Tahun 2019 dan 2020 secara molekuler dilaksanakan di Unit Biotek dan Unit Uji Virologi BBPMSOH. Kegiatan pengujian ini menggunakan metode konvensional *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (conRT-PCR). Pengujian ini terbagi dalam tahap ekstraksi, amplifikasi, dan elektroforesis.

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada pengujian identifikasi vaksin AI secara molekuler ini yaitu *isopropyl myristate* 98% (Sigma, USA), Kit ekstraksi *QiAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Germany), etanol absolut (Merck, Germany), 1 pasang primer AI subtipe H5 <sup>(20)</sup>, Kit Master

Mix *SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, USA), *Agarose Gel Electroforesis* (Thermo Fisher Scientific, USA), *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific, USA), *DNA Ladders 100 bp* (Thermo Fisher Scientific, USA), *Loading dye* (Thermo Fisher Scientific) dan *TAE Buffer 10×* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Alat yang digunakan pada pengujian ini antara lain syringe 3 mL, pipet volumetrik 10 mL, pipet-aid, sentrifus, mikrosentrifus, tabung mikrotube 1,5 mL, *MicroAmp® Reaction Tube with Cap* 0,2 mL (Applied Biosystem, China), mikropipet dan tips volume 10 µL, 100 µL, dan 1000 µL, vortex mixer, *biosafety cabinet* (BSC) class IIA, autoklaf, *bench hood*, mesin *thermal cycler Proflex™ 3x32-well PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA), peralatan elektroforesis *Inverter Fire Reader* (Thermo Fisher Scientific, USA).

### Sampel

Sampel yang digunakan dalam pengujian yaitu sampel vaksin AI inaktif Tahun Anggaran 2019 dan 2020, baik vaksin AI yang diperoleh dari sampel registrasi maupun sampel yang diperoleh dari kegiatan Pengkajian AI Unit Uji Virologi. Sampel tersebut merupakan sampel Vaksin AI Subtipe H5N1 tunggal, H9N2 tunggal, maupun kombinasi H5N1 dan H9N2.

### Ekstraksi *Ribonucleic Acid* (RNA)

Ekstraksi *Ribonucleic Acid* (RNA) pada sampel vaksin AI inaktif diawali dengan tahap *pre-treatment* menggunakan metode dari Claassen *et al.* (2003)<sup>(6)</sup>. Metode ini menggunakan reagen *isopropyl myristate* 98% (Sigma, USA). Tahap ini dimulai dengan mengocok botol vaksin dengan kuat selama 10 detik agar emulsi vaksin homogen. Sebanyak 2 mL emulsi vaksin dimasukkan dalam tabung sentrifus berukuran 15 mL yang telah ditambahkan dengan *isopropyl*

*myristate* (IPM) sebanyak 8 mL dan campur dengan *vortex mixer* hingga homogen selama 1 menit. Langkah selanjutnya yaitu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1000 g, pada suhu 8°C, selama 10 menit. Bagian atas yang berwarna keruh (campuran IPM dan minyak) sekitar 9-9,5 mL dibuang. Bagian bawah yang jernih (campuran *water-phase* dan antigen virus) dikoleksi. Antigen virus AI yang telah melalui proses *pre-treatment* diekstraksi RNANYa menggunakan metode *spin column* dengan kit ekstraksi komersial *QiAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Germany). Protokol kerja sesuai dengan instruksi penggunaannya <sup>(26)</sup>.

### **Conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (conRT-PCR)**

Pengujian identifikasi *seed* virus dari sediaan vaksin AI inaktif dilakukan secara molekuler menggunakan metode *conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (conRT-PCR). Primer untuk mendeteksi antigen virus AI pada pengujian ini yaitu primer spesifik H5, H9, N1, dan N2 (Tabel 1). Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan kit amplifikasi *SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, USA), dengan total volume reagen PCR 20 µL yang terdiri atas 5,5 µL *nuclease free water*, 12,5 µL *2x Reaction Mix*, 1 µL *SuperScript™ III RT/Platinum Taq Mix*, 0,5 µL untuk tiap primer (25 µM) <sup>(27, 31)</sup>. Reagen *master mix* ini dicampur dengan baik menggunakan *vortex mixer* selanjutnya di *alliquote* sebanyak 20 µL ke dalam sentrifus tube yang telah ditentukan pada *MicroAmp® Reaction Tube with Cap* 0,2 mL (Applied Biosystem, China). Sebanyak 5 µL *template* RNA ditambahkan ke dalam tiap reagen *master mix* dengan hati-hati. Pada pengujian ini digunakan *non-template control* (NTC) sebagai kontrol negatif dan RNA virus AI subtype H5N1 dan H9N2 sebagai kontrol positif.

Proses conRT-PCR dilakukan dengan mesin *thermal cycler Proflex™ 3x32-well PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA). Reaksi amplifikasi PCR gen H5 dilakukan dengan kondisi reaksi 30 menit pada suhu 48°C (*reverse-transcription*) sebanyak satu siklus, satu siklus 5 menit pada suhu 95°C (*hot start Taq Polymerase activation*), 40 siklus terdiri dari 30 detik pada suhu 95°C (denaturasi), 40 detik pada suhu 50°C (amplifikasi target), dan 40 detik 72°C (elongasi). Tahap elongasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit sebanyak 1 siklus. Adapun keseluruhan reaksi membutuhkan waktu sekitar 2 jam 23 menit <sup>(20)</sup>. Reaksi amplifikasi PCR gen H9 dilakukan dengan kondisi reaksi 30 menit pada suhu 48°C (*reverse-transcription*) sebanyak satu siklus, satu siklus 2 menit pada suhu 94°C (*hot start Taq Polymerase activation*), 40 siklus terdiri dari 30 detik pada suhu 94°C (denaturasi), 45 detik pada suhu 50°C (amplifikasi target), dan 45 detik 68°C (elongasi). Tahap elongasi akhir pada suhu 68°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus. Reaksi amplifikasi gen H9 ini membutuhkan waktu sekitar 2 jam 22 menit <sup>(1)</sup>. Reaksi amplifikasi PCR gen N1 dan N2 sesuai dengan metode amplifikasi gen N1-N9 dari Fereidouni *et al.* (2009)<sup>(14)</sup>. Reaksi amplifikasi gen N1 dan N2 ini membutuhkan waktu sekitar 1 jam 52 menit. Amplikon PCR divisualisasi pada 1,5% *agarose gel* (Thermo Fisher Scientific, USA) dengan pewarnaan *SYBR safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific, USA) dan menggunakan marker *DNA Ladders 100 bp* (Thermo Fisher Scientific, USA). Peralatan elektroforesis menggunakan *Inverter Fire Reader* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabel 1 Primer uji identifikasi vaksin AI

Target Gen	Jenis Primer	Sekuen Primer	Target Amplikon (suhu annealing)
H5 <sup>(20)</sup>	IVA-H5-F	5' - ACACATGCYCARGACATACT - 3'	545 bp (50°C)
	IVA-H5-R	5' - CTYTGRTTYAGTGTTGATGT - 3'	
H9 <sup>(1)</sup>	H9-KD-654F	5' - GACACAACAACGAGTGTGGC - 3'	682 bp (50°C)
	H9-KD-1335R	5' - GCCCATATATCTTGGATTTGAT - 3'	
N1 <sup>(14)</sup>	IVA-N1-F	5' - AGRCCTTGYYTCTGGGTTGA - 3'	126 bp (68°C)
	IVA-N1-R	5' - ACCGTCTGGCCAAGACCA - 3'	
N2 <sup>(14)</sup>	IVA-N2-F	5' - GCATGGTCCAGYTCAAGYTG - 3'	362 bp (68°C)
	IVA-N2-R	5' - CCYTTCCAGTTGTCTCTGCA - 3'	

### Analisis Data

Data yang diperoleh dalam pengujian ini dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam tabel dan gambar.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian identifikasi molekuler sampel vaksin AI registrasi tahun 2019-2020 menggunakan metode konvensional RT-PCR menunjukkan keseluruhan antigen pada sampel vaksin yang diuji identik sehingga memenuhi persyaratan uji identifikasi (Tabel 2). Hal ini ditunjukkan dengan dapat dideteksinya *seed* virus AI pada sediaan vaksin AI inaktif yang identik dengan virus yang dinyatakan pada kemasan maupun dokumen sediaan vaksin tersebut.

Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa produk vaksin AI yang diregistrasi pada tahun 2019-2020 terdiri dari vaksin inaktif yang mengandung antigen AI subtipe H5N1 dan H9N2 tunggal (monovalen), kombinasi H5N1 dan H9N2 (bivalen), atau kombinasi virus AI dengan *Newcastle Disease* (ND). Produk vaksin AI tersebut telah sesuai dengan regulasi vaksin AI yang ditetapkan oleh pemerintah Indonesia. Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 28/Permentan/T.140/ 5/2008 tentang Pedoman Penataan Kompartemen dan

Penataan Zona Usaha Perunggasan, vaksin AI yang digunakan di Indonesia yaitu vaksin inaktif (*killed vaccine*) atau jenis vaksin lain yang sudah disetujui oleh Menteri Pertanian dan strain virusnya homolog dengan subtipe virus isolat lokal (strain H5), serta vaksin juga harus mendapatkan nomor registrasi dari Menteri Pertanian<sup>(25)</sup>. Adapun nomor registrasi vaksin AI dalam pelaksanaannya didelegasikan kepada Direktur Jenderal Peternakan. Selanjutnya, melalui jejaring laboratorium veteriner, yaitu Influenza Virus Monitoring (IVM online), telah ditetapkan 4 strain vaksin AI H5N1 clade 2.1.3 yaitu A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006, A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007, A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007, dan A/Chicken/West Java (Nagrak) 30/2007. Namun, pada akhir tahun 2012 dilaporkan terjadi kasus kematian itik yang cukup tinggi karena AI H5N1 clade 2.3.2<sup>(9)</sup>. Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012 clade 2.3.2 mempunyai tingkat reaksi silang yang baik terhadap virus AI H5N1 clade 2.1.3 sehingga *seed* virus tersebut ditetapkan sebagai *seed* vaksin<sup>(3,10,18)</sup>. Sedangkan regulasi mengenai vaksin AI subtipe H9N2 tertuang pada Surat Edaran Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Nomor No. 22017/Pk.350/F/06/2018 tentang Perubahan Strain Tantang

AI H5N1 Dan Penetapan *Master Seed* Vaksin AI H9N2. *Master seed* untuk vaksin AI subtipe H9N2 yang ditetapkan oleh pemerintah yaitu A/Chicken / Sidrap / 07170094-44O/2017, A/Chicken / SouthSulawesi /712P2/2017, dan A/Chicken / WestJava / BBLitvet-RI/2017<sup>(11)</sup>.

Pengujian identitas ini dipandang perlu untuk mengetahui kemurnian dan menghilangkan kemungkinan bahwa vaksin yang diproduksi dan diedarkan telah terkontaminasi secara tidak sengaja selama proses produksi atau telah ditambahkan dengan strain lain tanpa izin. Menurut *Guideline on Influenza Vaccines* dari European Medicines Agency (EMA) (2017), setiap lot *seed* vaksin perlu diidentifikasi antigen Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) nya dengan metode yang sesuai<sup>(13)</sup>. Umumnya, antisera spesifik digunakan untuk mendeterminasi identitas HA dan NA. Jika reagen antigen tidak tersedia atau spesifisitas kurang mencukupi, maka sebagai alternatif uji

identitas dari *seed* virus dapat dikembangkan dengan metode PCR.

Menurut Natih *et al.* (2020), ditemukan satu sampel dengan kandungan antigen virus AI subtipe H9N2 pada sampel vaksin AI subtipe H5N1 tunggal dari sampel pengkajian tahun 2019 yang diperoleh dari Provinsi Sumatera Selatan<sup>(22)</sup>. Berdasarkan temuan ini maka pada kegiatan Pengkajian Unit Uji Virologi Tahun 2020 masih perlu dilakukan pengujian identitas vaksin AI, baik secara serologis maupun molekuler. Hasil pengkajian tahun 2020 ditampilkan pada Tabel 3. Hasil pengujian identifikasi pada sampel pengkajian AI tahun 2020 ditemukan ada satu sampel tidak memenuhi persyaratan (TMS) dari provinsi Bali karena *seed* vaksin yang digunakan tidak sesuai dengan label. Vaksin tersebut dinyatakan mengandung *seed* vaksin AI subtipe H5N1 tunggal, namun dapat diidentifikasi pula antigen virus AI subtipe H9N2, baik secara serologis maupun molekuler.

Tabel 2 Hasil identifikasi vaksin registrasi AI Tahun 2019 dan 2020

No	Kode Vaksin	Komposisi Vaksin	Seed vaksin	Identifikasi PCR		Hasil
				H5N1	H9N2	
1	S-0172019	H9N2	A/chicken/ SouthSulawesi/712P2/2017	-	+	Identik
2	S-0312019	H5N1 (2.3.2) H9N2	A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012	+		Identik
3	S-0322019	H9N2	A/chicken/ SouthSulawesi/712P2/2017	-	+	Identik
4	S-0892019	H5N1 (2.3.2)	A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012	+	-	Identik
5	S-1672019	H9N2	A/chicken/South Sulawesi/712P/2017	-	+	Identik
6	S-1682019	H9N2	A/chicken/South Sulawesi/712P/2017	-	+	Identik
7	S-1692019	H5N1(2.3.2) H9N2	A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012	+	+	Identik
8	S-3512019	H5N1 (2.3.2) ND	A/chicken/ SouthSulawesi/712P2/2017	+	-	Identik
9	S-3672019	H9N2	Genotype 7 A/chicken/West Java/Bblitvet-RI/2017	-	+	Identik

No	Kode Vaksin	Komposisi Vaksin	Seed vaksin	Identifikasi PCR		Hasil
				H5N1	H9N2	
10	S-4222019	H9N2 ND	A/chicken/South Sulawesi/712P2/2017 MD15 (Genotype 7)	-	+	Identik
11	S-4722019	H5N1 (2.3.2) H9N2 ND	A/duck/ Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 A/chicken/South Sulawesi/712P2/2017 MD15 (Genotype 7)	+	+	Identik
12	S-5232019	H5N1 (2.3.2) ND	A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 Lasota	+	-	Identik
13	S-5322021	H5N1 (2.3.2) ND	A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 MD15 (Genotype 7)	+	-	Identik
14	S-5352019	H5N1 (2.3.2) ND	A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 Lasota	+	-	Identik
15	S-5662019	H5N1 (2.3.2) H9N2	A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013 A/chicken/West java/BBLitvet-RI/2017	+	+	Identik
16	S-5842019	H5N1 (2.3.2)	A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012	+	-	Identik
17	S-5912019	H9N2 ND	A/chicken/South Sulawesi/712P2/2017 Lasota	-	+	Identik
18	S-5922019	H5N1 (2.3.2) H9N2	A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 A/chicken/South Sulawesi /712P/2017	+	+	Identik
19	S-1632020	H5N1 (2.3.2) H9N2	A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 A/chicken/West Java/BBLitvet-RI/2017	+	+	Identik
20	S-2412020	H5N1 (2.3.2) H9N2	A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 A/chicken/South Sulawesi /712P/2017	+	+	Identik
21	S-2422020	H5N1 (2.3.2) H9N2 ND	A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 A/chicken/South Sulawesi /712P/2017 Lasota	+	+	Identik
22	S-2462020	H5N1 (2.3.2) H9N2	A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 A/chicken/South Sulawesi /712P/2017	+	+	Identik

No	Kode Vaksin	Komposisi Vaksin	Seed vaksin	Identifikasi PCR		Hasil
				H5N1	H9N2	
23	S-5302020	H5N1 (2.3.2) H9N2 ND	A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 A/chicken/South Sulawesi /712P/2017	+	+	Identik
24	S-5922020	H5N1 (2.3.2) H9N2	Genotipe 7 A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 A/chicken/South Sulawesi /712P/2017	+	+	Identik

Keterangan: +=terdeteksi, -=tidak terdeteksi

Tabel 3 Hasil identifikasi kegiatan pengkajian vaksin AI Tahun 2020

No	Kode Vaksin	Komposisi Vaksin	Asal Vaksin	Identifikasi PCR		Hasil
				H5N1	H9N2	
1	PV-AI-0012020	H5N1 (2.3.2)	Jawa Barat	+	-	Identik
2	PV-AI-0022020	H5N1 (2.3.2)	Jawa Barat	+	-	Identik
3	PV-AI-0032020	H5N1 (2.3.2)	Jawa Barat	+	-	Identik
4	PV-AI-0042020	H5N1 (2.3.2)	Kalimantan Barat	+	-	Identik
5	PV-AI-0052020	H5N1 (2.3.2)	Kalimantan Barat	+	-	Identik
6	PV-AI-0062020	H5N1 (2.3.2)	Kalimantan Barat	+	-	Identik
7	PV-AI-0072020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Utara	+	+	Identik
		H9N2				
8	PV-AI-0082020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Utara	+	-	Identik
9	PV-AI-0092020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Utara	+	-	Identik
10	PV-AI-0102020	H5N1 (2.3.2)	Bali	+	+	Tidak Identik
11	PV-AI-0112020	H5N1 (2.3.2)	Bali	+	-	Identik
12	PV-AI-0122020	H5N1 (2.3.2)	Bali	+	-	Identik
13	PV-AI-0132020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Barat	+	-	Identik
14	PV-AI-0142020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Barat	+	-	Identik
15	PV-AI-0152020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Barat	+	-	Identik
16	PV-AI-0162020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Selatan	+	-	Identik
17	PV-AI-0172020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Selatan	+	-	Identik
18	PV-AI-0182020	H5N1 (2.3.2)	Sumatra Selatan	+	-	Identik

Keterangan: +=terdeteksi, -=tidak terdeteksi

Pada pengujian ini dilakukan *pre-treatment* dengan *isopropyl myristate* 98% (Sigma, USA) untuk memisahkan *aqueous phase* yang mengandung antigen virus AI dengan emulsi minyak pada sediaan vaksin AI inaktif sebelum

dilakukan ekstraksi RNA (Gambar 1). Prinsip tahap ini yaitu memisahkan komponen air dalam emulsi minyak dan mempresipitasikan protein dengan pelarut organik. Sanganagouda *et al.* (2019) telah membuktikan dari ketujuh



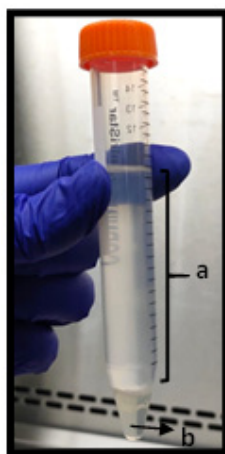
pelarut organik, yaitu *isopropyl myristate* (IPM), *isopropyl palmitate* (IPP), benzyl alkohol, butanol, aseton, *chloroform/methanol*, dan *dimethyl sulphoxide* (DMSO), IPM dan IPP mampu mengekstraksi antigen lebih baik pada vaksin *Infectious Bursal Disease* (IBD) dan *Newcastle Disease* (ND) dalam sediaan *oil adjuvant* <sup>(28)</sup>. Tahap ini penting dilakukan dalam identifikasi antigen karena *oil adjuvant*, sebagai immunomodulator, mampu mereduksi konsentrasi antigen sehingga *aqueous phase* yang mengandung antigen virus AI harus dipisahkan terlebih dahulu dari emulsi minyak <sup>(12)</sup>. *Aqueous phase* yang dihasilkan selanjutnya dilakukan ekstraksi RNA menggunakan metode *spin column*. Prinsip dari metode ini yaitu melisiskan virus AI dengan *buffer lysis* sehingga RNA dapat terlepas dan terikat oleh membran silika pada *column*, pencucian dengan *wash buffer*, kemudian *column* tersebut dilusi dengan Buffer AVE dan disentrifugasi sehingga diperoleh RNA virus AI yang murni.

Perbanyakan atau amplifikasi *Deoxy nucleic Acid* (DNA) dilakukan dengan teknik *one-step RT-PCR*. Teknik ini memungkinkan terjadinya sintesis *Ribonucleic acid* (RNA) menjadi *complementary Deoxy nucleic Acid* (cDNA) dan replikasi DNA terjadi dalam satu *tube* menggunakan primer spesifik, serta total RNA

dari RNA sampel target (*template*). Adapun target gen untuk identifikasi virus AI pada pengujian ini yaitu Hemagglutinin (H5 dan H9) serta Neuraminidase (N1 dan N2). Gambar 2 menunjukkan hasil RT-PCR antigen virus AI pada sampel vaksin AI. Hasil positif sub tipe H5N1 ditunjukkan dengan adanya pita ampikon dengan panjang 545 bp (H5) dan 126 bp (N1). Berbeda halnya dengan H5N1, positif H9N2 ditunjukkan dengan adanya ampikon dengan panjang 682 bp (H9) dan 362 bp (N2) (Gambar 3).

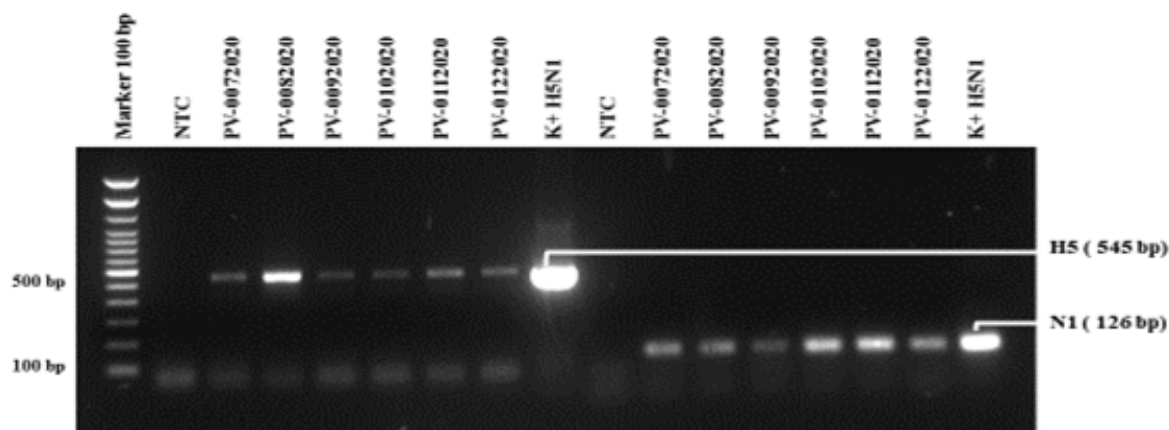
Pita ampikon yang terbentuk pada pengujian deteksi antigen AI pada sediaan vaksin inaktif dengan emulsi minyak (*oil adjuvant*) cenderung lebih tipis terlihat dibandingkan dengan hasil RT-PCR dari isolat virus (kontrol positif). Hal ini sesuai dengan penelitian Choi *et al.* (2010) <sup>(5)</sup> dan Yang *et al.* (2011) <sup>(32)</sup>. Beberapa faktor seperti virus vaksin, metode inaktivasi, valensi vaksin, dan komposisi *adjuvant* yang digunakan, mampu mempengaruhi kemudahan dalam ekstraksi vaksin <sup>(21)</sup>.

Genom virus AI terdiri dari delapan segmen dari RNA *negative sense* untai tunggal yang mengkode 11 protein (PB2, PB1, PB1-F2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, dan NS2/NEP). Genom tersebut dikelilingi oleh *envelope* yang memiliki tonjolan glikoprotein pada permukaan



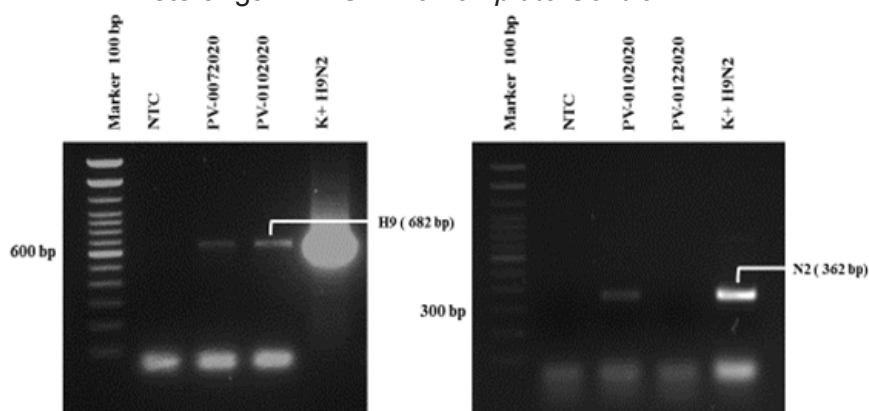
Gambar 1 *Pre-treatment* vaksin Avian Influenza inaktif *oil adjuvant*

Keterangan: a = emulsi minyak, b = *aqueous phase* yang mengandung antigen virus



Gambar 2 Hasil PCR sampel vaksin Avian Influenza terhadap gen H5 dan N1

Keterangan: NTC = *No Template Control*



Gambar 3 Hasil PCR sampel vaksin Avian Influenza terhadap gen H9 dan N2

Keterangan: NTC = *No Template Control*

luarnya, yaitu Hemagglutinin (HA/H) dan Neuraminidase (NA/N). Antigen HA dan NA ini yang menjadi dasar penamaan sub tipe virus Influenza Tipe A. Hingga saat ini diketahui 18 jenis HA (H1-H18) dan 11 jenis NA (N1-N11)<sup>(29)</sup>. Protein HA memiliki fungsi perlekatan (*attachment*) dan penggabungan (*fusion*) dengan reseptor inangnya, sedangkan NA berperan dalam proses keluarnya virion yang baru direplikasi (*budding*) dari sel inang dan aktivitas penghancuran reseptor. Protein HA merupakan antigen utama yang merangsang respon imun inang dengan antibodi protektif terhadap gejala klinis dan kematian. Antibodi terhadap kedua antigen ini mampu menetralkan virus AI dengan menghambat perlekatan dan pelepasan virus. Titer Hemagglutinasin/ *HA inhibiting* (HAI) dan titer NA inhibition

(NAI) sangat penting hubungannya dengan proteksi<sup>(15)</sup>.

*Conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (conRT-PCR) dipilih menjadi metode untuk memverifikasi kesesuaian virus AI yang digunakan dalam sediaan vaksin AI inaktif komersial. Metode ini mampu mengidentifikasi sub tipe virus AI dalam sediaan vaksin AI inaktif. Metode pengujian ini dapat dilanjutkan dengan *DNA Sequencing* untuk mengetahui sekuen strain virus yang digunakan dalam vaksin sehingga dapat dilakukan analisis asam amino<sup>(5)</sup>. Namun, terdapat faktor-faktor yang mampu mempengaruhi deteksi virus dengan metode RT-PCR ini. Faktor-faktor tersebut yaitu rancangan primer, jenis sampel, enzim, komposisi reagen, suhu dan siklus amplifikasi,

serta faktor teknis dan non-teknis lainnya<sup>(24)</sup>. Metode ekstraksi juga berpengaruh dalam keberhasilan mengidentifikasi virus dalam vaksin inaktif *oil adjuvant*<sup>(28)</sup>. Modifikasi antara metode conRT-PCR dan Real-Time RT-PCR (rRT-PCR) mampu meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas pengujian<sup>(16)</sup>.

## KESIMPULAN

Hasil uji identifikasi vaksin AI dalam rangka registrasi Tahun 2019-2020 ditemukan keseluruhan sampel identik (Memenuhi Syarat/MS), namun pada sampel pengkajian AI Unit Uji Virologi Tahun 2020 ditemukan satu sampel vaksin yang Tidak Memenuhi Syarat (TMS) karena hasil identifikasi tidak identik dengan yang dicantumkan di label. Pengujian identifikasi menggunakan metode conRT-PCR dipandang perlu untuk memverifikasi *seed* virus AI yang digunakan dalam sediaan vaksin AI inaktif *oil adjuvant* juga sebagai salah satu persyaratan yang harus dipenuhi dalam pengujian vaksin AI inaktif sesuai Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI).

## SARAN

Pengujian identitas vaksin AI menggunakan metode conRT-PCR ini membutuhkan pengujian lanjutan yaitu *DNA Sequencing* sehingga analisis dapat dilakukan lebih dalam, terutama terhadap vaksin yang Tidak Memenuhi Syarat (TMS) karena ditemukan hasil tidak identik. Modifikasi metode menggunakan rRT-PCR dipandang perlu untuk meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas pengujian.

## DAFTAR PUSTAKA

1. [AAHL] Australian Animal Health Laboratory. 2016. In House Australian Animal Health Laboratory (AAHL), Geelong, Australia.
2. Anonim. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia, Jilid I Edisi 5. Jakarta (ID): Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Halaman 80.
3. [BBPMSOH] Balai Besar Pengujian Mutu

- Sertifikasi Obat Hewan. 2014. Dalam rapat: Vaksinasi AI pada Itik /Unggas. Surat Keputusan no. 03051/PD 620/F/01/2013. 03 Januari 2013, Jakarta.
5. Beato MS, Monne I, Mancin M, Bertoli E, Capua I. 2010. A proof of principle study to identify suitable vaccine seed candidates to combat introductions of Eurasian lineage H5 and H7 subtype avian influenza virus. *Avian Pathol* 39: 375–382.
6. Choi JG, Lee YJ, Kim JY, Kim YH, Paek MR, Yang DK, Son SW, Kim JH. 2010. Molecular identification of the vaccine strain from the inactivated oil emulsion H9N2 low pathogenic avian influenza vaccine. *J. Vet. Sci.* 11(2):161–163. doi: 10.4142/jvs.2010.11.2.161.
7. Claassen I, Maas R, Daas A, Milne C. 2003. In vitro alternative assay for Newcastle Disease vaccine. *Pharmeuropa Special Issue*, BIO 2003-1:53–66.
8. Dharmayanti NLPI, Diwyanto K, Bahri S. 2012. Mewaspada perkembangan Avian Influenza (AI) dan keragaman genetik virus AI/H5N1 di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian*, 5(2):124–141.
9. Dirjen Bina Produksi Peternakan. 2014. Keputusan Direktur Jenderal Bina Produksi Peternakan Nomor 17/Kpts/PD.640/F/02.04. 04 Februari 2004, Jakarta, Indonesia.
10. [Dirjen PKH] Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2012. Data Statistik Peternakan tahun 2012.
11. [Dirjen PKH] Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2013. Vaksinasi AI pada Itik /Unggas. Surat Keputusan No. 03051/PD 620/F/01/2013. 03 Januari 2013. Jakarta, Indonesia.
12. [Ditjen PKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. Surat Edaran Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Nomor No. 22017/Pk.350/ F/06/2018. Jakarta, Indonesia.
13. [EMA] The European Agency for the Evaluation o Medicinal Products Evaluation of Medicines for Human Use. 2004. [internet]. [diunduh 2021 Agustus 17]. Tersedia pada: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-adjuvants-vaccines\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-adjuvants-vaccines_en.pdf)
14. [EMA] European Medicines Agency. 2017. Guideline on Influenza vaccines – Quality module. London, United Kingdom. [internet]. [diunduh 2021 Agustus 17]. Tersedia pada: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1_en.pdf)
15. Fereidouni SR, Starick E, Grund C, Globig

- A, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. 2009. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Veterinary Microbiology*, 135:253–260. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.077
16. Gilbert PB, Fong Y, Juraska M, Carpp LN, Monto AS, Martin ET, Petrie JG. 2019. HAI and NAI titer correlates of inactivated and live attenuated influenza vaccine efficacy. *BMC Infect. Dis.* 19:1–12.
17. Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2014. Perkembangan teknologi reverse transcriptase-polymerase chain reaction dalam mengidentifikasi genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases. *Wartazoa*. 24(1): 16–29.
18. Ilham N, Yusdja Y. 2010. Dampak flu burung terhadap produksi unggas dan kontribusi usaha unggas terhadap pendapatan peternak skala kecil di Indonesia. *Jurnal Agro Ekonomi*, 28(1):39–68.
19. Indriani R, Dharmayanti NLPI. 2014. Prototipe virus A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012 sebagai kandidat vaksin AI subtype H5N1 clade 2.3.2 pada itik lokal.
20. [Kemenkes RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2020. Situasi penyakit infeksi emerging, minggu epidemiologi 46. Jakarta, Indonesia. [internet]. [diunduh 2021 Agustus 17]. Tersedia pada: [https://infeksiemerging.kemkes.go.id/download/Situasi\\_Infem\\_2020\\_Minggu\\_46.pdf](https://infeksiemerging.kemkes.go.id/download/Situasi_Infem_2020_Minggu_46.pdf).
21. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. 2001. Identification and subtyping of Avian Influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 97:13–22.
22. Maas R, van Diepen M, Komen M, Oei H, Claassen I. 2002. Antigen content of inactivated Newcastle disease oil emulsion vaccines as an *in vitro* indicator of potency. *Dev Biol*, 111:313–318.
23. Natih KKN, Hidayanto NK, Kartini D, Astuti D. 2020. Pengkajian mutu vaksin Avian Influenza (AI) sub tipe H5N1 di tujuh provinsi di Indonesia tahun 2019. Buletin pengujian mutu obat hewan. ISSN:0852-9612. Bogor, Indonesia (29):70–79.
24. [OIE] World Organization for Animal Health. 2007. Vaccination: a tool for the control of Avian Influenza. Verona, Italia. [internet]. [diunduh 2021 Agustus 17]. Tersedia pada: <https://www.oie.int/doc/ged/D4410.PDF>
25. OIE. 2012. Avian Influenza disease. Chapter 2.3.4. Paris (France): OIE Terrestrial Manual.
26. [Permentan RI] Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia. 2008. Peraturan Nomor 28/Permentan/OT.140/5/2008. Pedoman penataan kompartemen dan penataan zona usaha perunggasan. 30 Mei 2008, Jakarta, Indonesia.
27. Protokol QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen Cat. No: 52904).
28. Protokol SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase. (Invitrogen Cat. No. 12574-026).
29. Sanganagouda K, Upamanyu V, Tiwari AK, Rai V, Mohd G, Singh H, Ansari A, Dhar P, Pandey AB. 2019. Optimisation and comparison of different methods for antigen extraction from oil adjuvant inactivated infectious bursal disease vaccine. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 40(2): 103-108.
30. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, et al. 2013. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog*, 9(10): 1–12. doi:10.1371/journal.ppat.1003657
31. [WHO] World Health Organization. 2021. Avian Influenza weekly update number 800. [internet]. [diunduh 2021 Agustus 17]. Tersedia pada: [https://www.who.int/docs/default-source/wpro--documents/emergency/surveillance/avianinfluenza/ai20210723.pdf?sfvrsn=223ca73f\\_129](https://www.who.int/docs/default-source/wpro--documents/emergency/surveillance/avianinfluenza/ai20210723.pdf?sfvrsn=223ca73f_129).
32. Wibawa H, Mulyawan H. 2018. Prosedur operasional baku: Deteksi virus Avian Influenza dengan teknik konvensional reverse transcription polymerase chain reaction (conRT-PCR). BBVet Wates, Yogyakarta, Indonesia.
33. Yang DK, Oh YI, Cho SD, Kang HK, Lee KW, Kim YH, Song JY. 2011. Molecular identification of the vaccine strain from the inactivated rabies vaccine. *J. Bacteriol Virol.* 41(1):47–54. doi 10.4167/jbv.2011.41.1.47.

## KAJIAN MUTU VAKSIN RABIES TAHUN 2011-2020

\* Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Ferry Ardiawan, Dodo Hermawan

Unit Uji Virologi

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

\* email : ketutkaruni@yahoo.com

### ABSTRAK

Penyakit rabies adalah penyakit penting karena bersifat zoonotik dan menyebabkan kematian. Salah satu program pengendalian dan pemberantasan penyakit rabies adalah dengan melakukan vaksinasi pada hewan penular rabies. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) menjalankan tugas pokok dan fungsinya untuk melakukan pengujian mutu vaksin rabies yang akan beredar atau yang telah beredar di Indonesia. Tujuan dari penulisan ini adalah untuk mengkaji sampel vaksin rabies yang diuji mutunya di BBPMSOH dari tahun 2011-2020. Total sampel vaksin rabies sebanyak 324, yang terdiri dari 19 sampel berasal dari proses pendaftaran, 46 sampel dari kiriman daerah dinas Provinsi/Kabupaten/Kota, dan 259 sampel dari pemantauan/pengkajian di beberapa provinsi di Indonesia. Rangkaian uji mutu dilakukan terhadap sampel vaksin rabies yang meliputi uji inaktivasi, keamanan dan potensi sesuai Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) 2018. Pengujian mutu vaksin rabies menunjukkan hasil memenuhi syarat (MS) sebanyak 275 sampel (84.88%), sedangkan sampel vaksin rabies yang tidak memenuhi syarat (TMS) sebanyak 49 sampel (15.12%).

**Kata kunci:** rabies, vaksin hewan, pengkajian, mutu, potensi

### ABSTRACT

*Rabies is an important disease because it is zoonotic and causes death. One of the programs to control and eradicate rabies is to vaccinate animals that transmit rabies. The National Veterinary Drug Assay Laboratory (NVDAL) carries out its main duties and functions to test the quality of rabies vaccines that will be circulated or have been circulating in Indonesia. The purpose of this paper is to examine the quality of rabies vaccine samples tested at NVDAL from 2011-2020. A total of 324 rabies vaccine samples, consisting of 19 samples from the registration process, 46 samples from provincial/district/city technical services, and 259 samples from monitoring/study in several provinces in Indonesia. A series of quality tests were carried out on samples of rabies vaccine which included inactivation, safety and potency tests according to Indonesian Pharmacopoeia of Veterinary Medicine (FOHI) 2018. The quality test for rabies vaccines showed results that met the requirements (passed/MS) were 275 samples (84.88%), while samples of rabies vaccines that did not meet the requirements (not passed/TMS) were 49 samples (15.12%).*

**Keywords:** rabies, veterinary vaccine, study, quality, potency

## PENDAHULUAN

Rabies adalah salah satu penyakit zoonosis penting yang dapat menyebabkan kematian. Infeksi virus bersifat akut pada sistem saraf pusat, yang disebabkan oleh genus *lyssavirus* dari famili Rhabdoviridae. Virus rabies berbentuk peluru dan memiliki genom RNA yang beruntai tunggal. Virus rabies dapat menginfeksi semua mamalia, termasuk manusia, kucing, anjing, dan satwa liar dan hewan ternak. Virus ini terdapat dalam air liur hewan yang terinfeksi, dan cara penularan yang paling sering ke manusia adalah melalui gigitan, cakaran atau jilatan pada kulit yang rusak atau selaput lendir. Anjing adalah reservoir penting untuk virus rabies disebut hewan penular rabies (HPR), dan gigitan anjing merupakan penyebab kasus pada manusia. Virus rabies menginfeksi neuron motorik perifer, dan gejala klinis akan terjadi setelah virus mencapai sistem saraf pusat, dan berakibat fatal karena mematikan.<sup>(1, 2, 7,10)</sup>

Vaksinasi adalah satu-satunya cara efektif untuk mengendalikan rabies. Penelitian dimulai pada tahun 1882, ketika ilmuwan Perancis yaitu Louis Pasteur, menemukan bahwa rabies adalah suatu agent yang sangat kecil. Dia mengembangkan teknik untuk menumbuhkan dan melemahkan virus pada hewan, dan akhirnya mengembangkan vaksin yang mampu melindungi anjing dari rabies.<sup>(8)</sup>

Pemerintah Indonesia melalui Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian, mencanangkan program pemberantasan rabies secara nasional dengan target bebas rabies pada tahun 2030. Untuk menjalankan program tersebut, dirancang suatu peta jalan yang disebut sebagai "Masterplan Nasional Pemberantasan Rabies di Indonesia" dengan misi yaitu secara bertahap mengurangi rabies di Indonesia dan tujuan akhir untuk membebaskan masyarakat Indonesia dari risiko tertular rabies akhirnya

memberantas rabies melalui vaksinasi massal secara terus menerus dan profilaksis pasca pajanan; adapun targetnya adalah eliminasi rabies manusia yang dimediasi anjing di Indonesia.<sup>(3, 5)</sup>

Penyakit rabies termasuk prioritas dalam Keputusan Menteri Pertanian Nomor 4026/Kpts./OT.140/3/2013 tentang Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS), karena berdampak terhadap sosial-ekonomi dan kesehatan masyarakat. Ada lima PHMS di Indonesia yang secara khusus sangat diperhatikan yaitu Rabies, Anthraks, Brucellosis, Avian Influenza, dan Hog Cholera (RABAH).<sup>(6)</sup>

Tugas pokok dan fungsi Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) yang diamanatkan melalui Peraturan Menteri Pertanian No. 43 Tahun 2020 Tanggal 23 Desember 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis Lingkup Direktorat Jenderal Peternakan dan Keswan tentang Organisasi dan Tata Kerja Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan adalah melakukan pengujian, pemantauan, dan pengkajian obat hewan dalam rangka pengawasan konsistensi mutu obat hewan yang telah diregistrasi yang beredar di Indonesia. Pelaksanaan kegiatan pengujian mutu dan sertifikasi obat hewan terdiri dari pengujian mutu obat hewan dalam rangka pendaftaran obat baru dan pendaftaran ulang, pengujian mutu obat hewan dalam rangka pengujian sewaktu-waktu dan pengujian mutu obat hewan yang diperoleh dari kiriman daerah Dinas Provinsi/Kabupaten/Kota (KD) seluruh Indonesia serta pengujian dalam rangka pelayanan teknis (PT). Balai Besar Pengujian dan Sertifikasi Obat Hewan juga melakukan pemantauan/pengkajian obat hewan dalam rangka pengawasan konsistensi mutu obat hewan yang telah terdaftar yang beredar di Indonesia.

Status bebas rabies di Indonesia ada

delapan (8) provinsi, yaitu Kepulauan Riau, Bangka Belitung, DKI Jakarta, Jawa Tengah, DI Yogyakarta, Jawa Timur, Papua Barat, dan Papua. Daftar pulau yang dibebaskan melalui pengendalian dan surveilans adalah Pulau Mentawai, Sumatera Barat; Pulau Meranti, Riau; Pulau Enggano, Bengkulu; Pulau Weh, Aceh; Pulau Pisang, Lampung; Pulau Tarakan, Nunukan, dan Sebatik, Kalimantan Utara; Pulau Tabuan, Lampung; dan Pulau Malakehi, Buhias, Pahepa, Tagulandang, Ruang, dan Biaro, Sulawesi Utara.<sup>(3)</sup>

Salah satu strategi pengendalian dan pemberantasan rabies di Indonesia adalah dengan menerapkan program vaksinasi. Salah satu syarat keberhasilan vaksinasi adalah tersedianya vaksin dengan mutu tinggi. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan menjamin mutu obat hewan baik dalam pendaftaran untuk diedarkan maupun obat hewan yang sudah beredar di Indonesia.

Vaksin rabies yang beredar di Indonesia adalah vaksin rabies inaktif yang berasal dari produksi lokal dan vaksin import yang sudah terdaftar di Indonesia. Vaksin rabies untuk hewan kesayangan yang beredar di Indonesia adalah vaksin rabies tunggal maupun kombinasi seperti Biocan (strain VNUKOVO 32) – Bioveta, Chekoslovakia, Eurican DHPPI 2 LR (strain Pasteur PV Wistar) – Merieux, France, Hexadog (strain Pasteur – Wistar G52) – Merieux, France, Neo Rabivac TC (starin Nishigahara) – Vaksindo Indonesia, Nobivac LR (strain Pasteur) – Intervet, The Netherlands, Nobivac Rabies (strain pasteur/RIV) – Intervet, The Netherlands, Pentadog (strain Pasteur – Wistar G52) – Merieux, France, Rabdomun (strain LEP) – Pitman Moore/Schering Plough, Germany, Rabguard TC (strain HCP – SAD) – Smith Kline Beechman, USA, Rabiffa (strain Pasteur – GS7) – Rhone Merieux, France, Rabigen Mono (strain Pasteur VP 12) – Virbac, France, Rabisin (strain Pasteur – GS57) –

Merieux, France, Rabivet (*strain Pasteur*) – Pusvetma, Indonesia, Rabivet Supra 92 (*strain Pasteur*) – Pusvetma, Indonesia, Rabvac 3 (*strain High Cell Passage Street Alabama Dufferin/HCP SAD*) – Solvay Animal Health, USA.<sup>(11)</sup>

Tujuan dari penulisan ini adalah mengkaji mutu vaksin rabies dari sampel vaksin rabies tahun 2011 sampai tahun 2020 yang diuji di BBPMSOH. Sampel rabies yang diuji dari sampel pendaftaran, KD dan pemantauan/pengkajian. Sesuai dengan visi BBPMSOH yang menjamin kualitas obat hewan yang beredar di Indonesia, maka perlu dilakukan pengkajian vaksin rabies yang beredar di lapangan untuk mengetahui mutu vaksin rabies yang telah terdaftar dan beredar di lapangan dan faktor penurunan mutu vaksin, yang disebabkan oleh faktor eksternal seperti penyimpanan, transportasi, distribusi, dan pemakaiannya yang terkait dengan penanganan rantai dingin.

## METODE

### Waktu dan Tempat

Pengujian mutu vaksin rabies dilaksanakan di unit uji virologi BBPMSOH pada sampel vaksin rabies dari tahun 2011 sampai tahun 2020.

### Metode Pengujian Sampel

Pengujian mutu terhadap sampel vaksin rabies meliputi:

1. Uji inaktivasi yang bertujuan untuk mengetahui kesempurnaan dari inaktivasi virus rabies didalam vaksin tersebut. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila *suckling mice* yang diinokulasi dengan vaksin rabies secara *intracerebral* (IC) tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus rabies yang dapat dilihat melalui pengamatan gejala klinis terhadap rabies selama 14 hari.<sup>(4)</sup>

2. Uji keamanan yang bertujuan untuk mengetahui keamanan vaksin rabies. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mencit yang diinokulasi dengan vaksin rabies secara *intraperitoneal* (IP) tidak menunjukkan gejala klinis rabies selama pengamatan 7 hari.<sup>(4)</sup>
3. Uji potensi dengan metode Habel yang bertujuan untuk mengetahui potensi vaksin rabies terhadap virus rabiesantang. Vaksin diencerkan 10 kali dengan larutan garam faali steril (NaCl). Lima puluh ekor mencit sehat dan peka umur 3-4 minggu, dibagi menjadi 5 kelompok, divaksinasi 0,25 mL secara IP dengan vaksin yang telah diencerkan. Empat puluh ekor mencit lainnya tidak divaksinasi, dibagi menjadi 4 kelompok dan digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat belas hari pascavaksinasi, setiap kelompok vaksinasi ditantang secara IC dengan 0,03 mL dari pengenceran virus rabies strain ganas (*Challenge Virus Standart/ CVS*)  $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$  dan  $10^{-5}$  per ekor. Sedangkan 4 kelompok mencit kontrol ditantang dengan 0,03 mL dari pengenceran virus rabies strain ganas (CVS)  $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$  dan  $10^{-8}$  per ekor. Pengamatan dan pencatatan mencit yang mati atau menunjukkan gejala rabies dalam jangka waktu 5-14 hari setelah tantang dilakukan selama 14 hari. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila nilai indeks proteksi antara kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak kurang dari 3.0 ( $\geq 10^{3.0} \text{MLD}_{50}$ ).<sup>(4)</sup>

### Bahan dan Peralatan

Bahan dan alat yang digunakan pada saat pengujian mutu sampel rabies adalah: vaksin rabies, virus tantang rabies standar (CVS), *suckling mice* umur 1 hari, mencit umur 4 minggu, *syringe* 3 mL, *syringe* 1 mL, *syringe* untuk uji tantang, tabung 50 mL, rak tabung,

garam faali steril (NaCl), alkohol 70%, marker, label, dan alat pelindung diri (APD).

### HASIL

Dari kegiatan pengujian mutu vaksin rabies tahun 2011 sampai tahun 2020 yang telah dilaksanakan di laboratorium unit uji virologi BBPMSOH didapatkan data sampel sbb:

1. Sampel vaksin rabies kurun waktu tahun 2011-2020 adalah sampel vaksin rabies inaktif yang berasal dari 11 merek dagang, terdiri dari 3 vaksin rabies yang diproduksi di Indonesia (lokal) dan 8 vaksin rabies yang diproduksi dari negara lain (impor) Tabel 1.
2. Jumlah sampel vaksin rabies inaktif tunggal yang diuji mutunya adalah sebanyak 324 sampel, dengan rincian sebagai berikut:
  - a. Jumlah sampel Pendaftaran : 19 sampel
  - b. Jumlah sampel Kiriman Daerah 46 sampel
  - c. Jumlah Pemantauan / pengkajian : 259 sampel

Selanjutnya untuk menentukan mutu sampel vaksin rabies tersebut dilakukan uji inaktivasi, keamanan dan potensi sesuai dengan FOHI 2018. Hasil rinci pengujian mutu sampel vaksin rabies disajikan pada Tabel 2, 3, 4, 5, dan Gambar 1



Tabel 1. Vaksin Rabies Yang Diuji di BBPMSOH tahun 2011- 2020

No	Nama Vaksin	Produksi	Strain
1	Rabisin	Merial Lab., France	G52
2	Rabivet Supra	Pusat Veteriner Farma, Indonesia	Pasteur
3	Nobivac Rabies	Intervet International B,V (MSD Animal Health), The Netherlands	Pasteur RIV
4	Biocan	Bioveta, Chekoslovakia	VNUKOVO 32
5	Rabvac	Solvay Animal Helath, USA	High Cell Passage Street Alabama Dufferin/HCP SAD)
6	Defensor 3	Zoetis Inc., USA	PV-Paris
7	Rabigen Mono	Virbac, France	Pasteur VP 12
8	Caprivac RBS	PT. Caprifarmindo Lab., Indonesia	Pasteur
9	Rabies Kill Vaccine	Komipharm International Co. Ltd., Korea Selatan	Flury LEP
10	Canishot RVF	Choogang Vaccine Labs, Korea	Pasteur
11	Neo Rabivet	Pusat Veteriner Farma, Indonesia	Pasteur

Tabel 2. Hasil Rangkaian Pengujian Mutu Vaksin Rabies Tahun 2011-2020

NO	Tahun	JENIS UJI	PENDAFTARAN		KIRIMAN DAERAH		PEMANTAUAN/ PENGKAJIAN	
			MS	TMS	MS	TMS	MS	TMS
1	2011	Inaktivasi	4	0	4	0	32	0
		Keamanan	4	0	4	0	TD	TD
		Potensi	4	0	4	0	32	0
2	2012	Inaktivasi	3	0	4	0	32	0
		Keamanan	3	0	4	0	TD	TD
		Potensi	3	0	4	0	30	2
3	2013	Inaktivasi	1	0	1	0	38	0
		Keamanan	1	0	1	0	TD	TD
		Potensi	0	1	0	1	30	8
4	2014	Inaktivasi	1	0	15	0	26	0
		Keamanan	1	0	15	0	TD	TD
		Potensi	1	0	11	4	19	7
5	2015	Inaktivasi	4	0	2	0	TA	TA
		Keamanan	4	0	2	0	TA	TA
		Potensi	4	0	1	1	TA	TA

NO	Tahun	JENIS UJI	PENDAFTARAN		KIRIMAN DAERAH		PEMANTAUAN/ PENGKAJIAN	
			MS	TMS	MS	TMS	MS	TMS
6	2016	Inaktivasi	1	0	9	0	TA	TA
		Keamanan	1	0	9	0	TA	TA
		Potensi	1	0	8	1	TA	TA
7	2017	Inaktivasi	2	0	2	0	24	0
		Keamanan	2	0	2	0	TD	TD
		Potensi	1	1	2	0	22	2
8	2018	Inaktivasi	0	1	2	0	39	0
		Keamanan	1	0	2	0	TD	TD
		Potensi	1	0	2	0	38	1
9	2019	Inaktivasi	2	2	5	0	46	0
		Keamanan	1	1	5	0	46	0
		Potensi	2	0	5	0	36	10
10	2020	Inaktivasi	TA	TA	2	0	22	0
		Keamanan	TA	TA	2	0	22	0
		Potensi	TA	TA	2	0	14	8
		<b>Inaktivasi</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>46</b>	<b>0</b>	<b>259</b>	<b>0</b>
Jumlah		<b>Keamanan</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>46</b>	<b>0</b>	<b>68</b>	<b>0</b>
		<b>Potensi</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>39</b>	<b>7</b>	<b>221</b>	<b>38</b>

Total  
**Inaktivasi : MS : 323/324 = 99.69 %**  
**TMS : 1/324 = 0.31 %**  
**Keamanan : MS : 132/133 = 99.25 %**  
**TMS : 1/133 = 0.75 %**  
**Potensi : MS : 277/324 = 85.49%**  
**TMS : 47/324 = 14.51%**

Keterangan: TD= Tidak Dilakukan; TA= Tidak Ada; MS= Memenuhi Syarat; TMS=Tidak Memenuhi Syarat

Tabel 3. Hasil Penilaian Mutu Vaksin Rabies Pendaftaran Tahun 2011-2020

Tahun	Jumlah Sampel	Jumlah Sampel MS	Jumlah Sampel TMS
2011	4	4	0
2012	3	3	0
2013	1	0	1

Tabel 3. Hasil Penilaian Mutu Vaksin Rabies Pendaftaran Tahun 2011-2020

Tahun	Jumlah Sampel	Jumlah Sampel MS	Jumlah Sampel TMS
2014	1	1	0
2015	4	4	0
2016	1	1	0
2017	2	1	1
2018	1	0	1
2019	2	1	1
2020	0	0	0
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>15 (78.95%)</b>	<b>4 (21.05%)</b>

Keterangan: MS= Memenuhi Syarat; TMS=Tidak Memenuhi Syarat

Tabel 4. Hasil Penilaian Mutu Vaksin Rabies Kiriman Daerah Tahun 2011-2020

Tahun	Jumlah Sampel	Jumlah Sampel MS	Jumlah Sampel TMS
2011	4	4	0
2012	4	4	0
2013	1	0	1
2014	15	11	4
2015	2	1	1
2016	9	8	1
2017	2	2	0
2018	2	2	0
2019	5	5	0
2020	2	2	0
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>39 (84.78%)</b>	<b>7 (15.22%)</b>

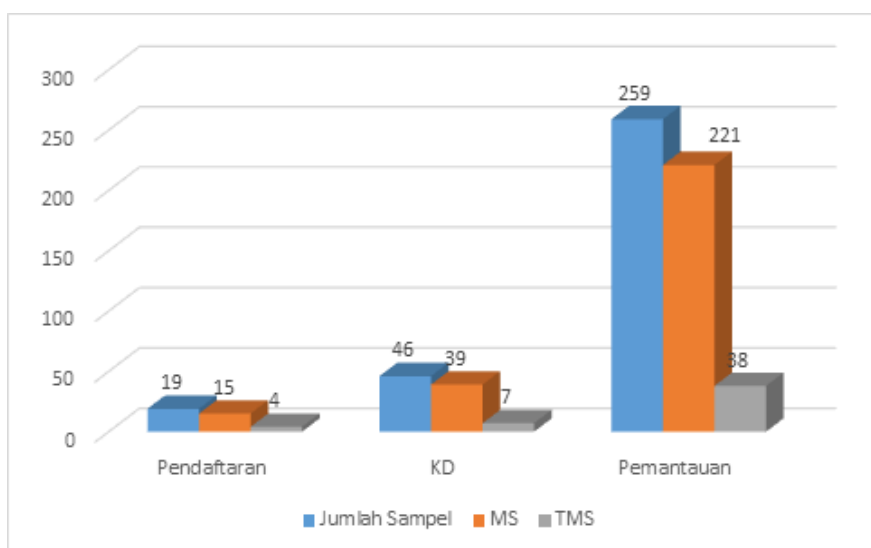
Keterangan: MS= Memenuhi Syarat; TMS=Tidak Memenuhi Syarat

Tabel 5. Hasil Penilaian Mutu Vaksin Rabies Pemantauan/Pengkajian Tahun 2011-2020

Tahun	Jumlah Provinsi	Nama Provinsi	Jumlah Sampel	Jumlah Sampel MS	Jumlah Sampel TMS
2011	13	Jabar, Jateng, Riau, Jambi, Sumbar, Sumut, Kalbar, Kalteng, NTT, Bali, Sulteng, Sultra, Maluku	32	32	0

Tahun	Jumlah Provinsi	Nama Provinsi	Jumlah Sampel	Jumlah Sampel MS	Jumlah Sampel TMS
2012	16	NAD, Sumbar, Sumsel, Sumut, Lampung, Riau, Jambi, Jabar, Banten, Kalsel, Kalteng, Sulsel, Sulut, NTT, Bali, Maluku	32	30	2
2013	19	NAD, Bengkulu, Sumbar, Sumsel, Sumut, Lampung, Riau, Jambi, Jabar, Banten, Kalsel, Kalteng, Kaltim, Sulsel, Sulbar, Sulut, Sultra, Bali, Maluku	38	30	8
2014	13	NAD, Sumbar, Sumsel, Sumut, Jabar, Bali, Kaltim, Kalteng, Sulsel, Sulbar, Sulut, Sultra, NTT	26	19	7
2017	12	Sumut, Sumbar, Sumsel, Sulsel, Bali, Maluku Utara, Banten, Jawa Barat, NAD, Bengkulu, Jambi, Lampung	24	22	2
2018	13	Sumut, Sumbar, Sumsel, Kalsel, Bali, Kalteng, NTT, Riau, Kalbar, Bengkulu, Sulsel, Jambi, Lampung	39	38	1
2019	16	NA, Sumbar, Sumsel, Sumut, Lampung, Riau, Jambi, Kalsel, Sulsel, Sulteng, Sulut, Sultra, Bali, Gorontalo, NTB, NTT	46	36	10
2020	6	Sumut, Kalbar, Jabar, Bali, Sumbar, Sumsel	22	14	8
<b>Total</b>			<b>259</b>	<b>221 (85.33%)</b>	<b>38 (14.67%)</b>

Keterangan: Tahun 2015 dan 2016 tidak ada pemantauan/pengkajian mutu vaksin rabies; MS= Memenuhi Syarat; TMS=Tidak Memenuhi Syarat



Gambar 1. Rekapitulasi Mutu Vaksin Rabies Tahun 2011-2020

Hasil uji inaktivasi pada *suckling mice* menunjukkan hasil 100% terinaktivasi sempurna sebanyak 323 (99.69%) sampel dari 324 sampel, dan yang tidak sempurna inaktivasinya sebanyak 1 (0.31%) sampel vaksin rabies yang berasal dari sampel rabies pendaftaran. Hasil uji keamanan pada mencit menunjukkan hasil 100% aman tidak menunjukkan gejala klinis sebanyak 132 (99.25%) sampel dari 133 sampel, dan yang tidak aman sebanyak 1 (0.75%) sampel vaksin rabies yang berasal dari sampel pendaftaran.

Uji potensi vaksin rabies dilakukan dengan uji Metode Habel. Sampel vaksin yang mempunyai indeks proteksi minimal 3.0 berjumlah 277 (85.49%) sampel dari 324 sampel. Sampel vaksin yang mempunyai indeks proteksi kurang dari 3.0 berjumlah 47 (14.51%) sampel.

Penilaian mutu sampel vaksin rabies tahun 2011-2020 berdasarkan hasil uji inaktivasi, keamanan dan potensi, diperoleh sebanyak 275 (84.88%) sampel yang memenuhi syarat (MS) dan sebanyak 49 (15.12%) sampel yang tidak memenuhi syarat (TMS). Rekapitulasi mutu vaksin rabies tahun 2011-2020 dari 19 sampel pendaftaran ada sebanyak 15 MS dan 4 TMS; dari 46 sampel kiriman daerah ada sebanyak 39 MS dan 7 TMS; dari 259 sampel pemantauan/pengkajian ada sebanyak 221 MS dan 38 TMS.

## PEMBAHASAN

Telah dilakukan uji inaktivasi, uji keamanan, dan uji potensi terhadap vaksin rabies inaktif dari sampel vaksin rabies tahun 2011-2020. Rangkaian uji tersebut merupakan pengujian khusus mutu vaksin rabies yang dilakukan di BBPMSOH. Peran BBPMSOH dalam pengendalian, pencegahan dan pemberantasan rabies di Indonesia adalah sesuai dengan tugas pokok dan fungsinya. Pengujian mutu vaksin rabies dilakukan pada vaksin rabies yang baru

terdaftar dan yang daftar ulang di Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian. Hanya vaksin yang memenuhi syarat yang boleh diedarkan di Indonesia. Vaksin rabies yang beredar legal di Indonesia adalah vaksin rabies inaktif (Tabel 1).

Jumlah sampel vaksin rabies dari proses pendaftaran selama 10 tahun (2011-2020) sebanyak 19 sampel. Sampel vaksin rabies pendaftaran tidak banyak yang diuji di BBPMSOH karena pendaftaran ulang dilakukan 10 tahun sekali sesuai Keputusan Menteri Pertanian Nomor 695/KPTS/TN.260/8/96 tentang Syarat dan tata Cara Pendaftaran dan Pengujian Mutu Obat Hewan. Sampel vaksin rabies pendaftaran umumnya sampel merupakan sampel dimana pemohon yang langsung membawa ke BBPMSOH atau merupakan hasil sampling sewaktu-waktu dari BBPMSOH ke produsen atau distributor.

Penerapan tatalaksana rantai dingin dari sampel rabies pendaftaran umumnya sudah dilaksanakan dengan baik. Hasil pengamatan suhu pada saat sampel diterima di BBPMSOH sesuai dengan rekomendasi yaitu 2-8° C. Sebanyak 2 dari 19 sampel rabies pendaftaran tidak memenuhi syarat untuk masing-masing uji inaktivasi dan keamanan (Tabel 2 dan 3), hal ini disebabkan karena proses dalam pembuatan vaksin yang tidak terinaktivasi sempurna sehingga pada pengamatan uji inaktivasi dan keamanan ada gejala klinis rabies setelah hari ke lima pasca inokulasi, artinya vaksin tersebut tidak aman karena interpretasi hasil uji inaktivasi dan keamanan dalam FOHI 2018 adalah 100% tidak menimbulkan gejala klinis rabies. Uji inaktivasi penting dilakukan pada vaksin inaktif yang mengandung virus patogen bersifat zoonotik. Titik kritis pada proses bertujuan untuk memastikan bahwa virus dalam vaksin tersebut telah diinaktivasi secara sempurna sehingga aman digunakan, tidak akan menyebarkan virus ke lingkungan dan tidak

akan menimbulkan wabah. Sebanyak 2 dari 19 sampel tidak memenuhi syarat pada uji potensi karena vaksin tersebut mutunya menurun terlihat dari indeks proteksi kurang dari 3.0, tidak sesuai dengan komposisinya dan persyaratan mutu sesuai FOHI 2018. Berkurangnya potensi vaksin karena stabilitasnya menurun.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan juga menguji mutu vaksin rabies dari kiriman daerah Dinas Provinsi/Kabupaten/Kota. Sampel vaksin rabies dari kiriman daerah umumnya dikirim karena ingin mengetahui potensi dari vaksin tersebut setelah diterima dan disimpan oleh Dinas Provinsi/Kabupaten/Kota. Informasi yang diterima biasanya adalah adanya kejadian mati listrik selama penyimpanan vaksin tersebut. Sebanyak 15.22% dari sampel tidak memenuhi syarat uji potensi, karena nilai indeks proteksi kurang dari 3.0. Menurunnya potensi karena vaksin terkena suhu di luar kisaran penyimpanan yang direkomendasikan.<sup>(12)</sup>

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan melakukan pengkajian serta pemantauan vaksin rabies di lapangan di beberapa Provinsi di Indonesia (Tabel 5). Vaksin rabies yang digunakan di lapangan perlu diuji di BBPMSOH untuk mengetahui mutu vaksin tersebut setelah diedarkan. Pengujian mutu penting dilakukan karena vaksin rabies akan melalui perjalanan rantai dingin dari produsen, distributor, dinas provinsi, dinas kabupaten dan vaksinator.

Uji potensi dilakukan untuk mengetahui potensi vaksin terhadap virusantang standar yang ganas. Hasil uji potensi vaksin rabies tidak mencapai 100% MS menunjukkan vaksin tersebut ada yang tidak bermutu baik. Sebanyak 14.67% sampel rabies pemantauan/pengkajian TMS, sedangkan rekapitulasi sampel rabies dari tahun 2011-2020 sebanyak 14.51% TMS karena mempunyai indeks proteksi kurang dari 3.0.

Beberapa hal yang dapat menyebabkan penurunan nilai indeks proteksi antara lain akibat penanganan rantai dingin vaksin yang tidak sesuai dengan standar operasional prosedur (SOP) mulai dari produsen sampai konsumen, faktor stabilitas dan masa kadaluarsa vaksin. Titik kritis yaitu pada penyimpanan dan sistem rantai dingin. Vaksin harus disimpan dalam *cool room* khusus vaksin bersuhu 2-8°C. Hendaknya *cool room* ini selain tersedia di produsen juga terdapat di wilayah pemasaran/kantor cabang/distributor vaksin. Penyusunan vaksin dalam *cool room* juga harus memperhatikan kepadatan tumpukan agar sirkulasi udara dingin tersebar secara merata. Selanjutnya dari produsen, vaksin didistribusikan ke wilayah-wilayah pemasaran/kantor cabang/ distributor menggunakan mobil khusus pengirim vaksin yang dilengkapi dengan mesin pendingin agar suhunya tetap terjaga 2-8°C. Sistem rantai dingin ini sangat penting karena merupakan suatu sistem untuk menjaga vaksin tersimpan pada suhu dan kondisi yang telah ditetapkan mulai dari produsen hingga vaksin sampai di tangan peternak sehingga mutu dan keamanan vaksin tetap terjaga.

Mutu vaksin dapat dipengaruhi oleh sifat imunogenik strain vaksin, kandungan jumlah mikroorganisme, cara pembuatan, distribusi dan penyimpangannya. Faktor-faktor tersebut merupakan mata rantai yang memerlukan penanganan dan pengawasan serta pemantauan agar vaksin selalu terjamin mutunya. Rantai dingin sangat penting dalam hal ini juga tempat penyimpanan vaksin rabies. Peralatan, penyimpanan dan transportasi yang direkomendasikan (ruang pendingin, lemari es, *freezer*, kotak dingin, pembawa vaksin dan transportasi harus memenuhi standar kinerja yang ditetapkan oleh WHO. Prosedur manajemen persediaan/stok vaksin rabies harus ditetapkan sehingga vaksin tidak disimpan lebih lama dari yang diperlukan di

tingkat pusat, regional dan kabupaten. <sup>(9,12)</sup>

Vaksin adalah zat biologis sensitif yang secara progresif kehilangan potensinya yaitu kemampuan untuk memberikan perlindungan terhadap penyakit. Hilangnya potensi ini jauh lebih cepat bila vaksinya terkena suhu di luar kisaran penyimpanan yang direkomendasikan. Setelah potensi vaksin telah hilang, mengembalikan vaksin ke kondisi penyimpanan yang benar tidak dapat memulihkannya. Setiap kehilangan potensi adalah permanen dan ireversibel. Jadi, penyimpanan vaksin pada suhu yang direkomendasikan dengan benar kondisi sangat penting agar potensi vaksin penuh dipertahankan hingga saat administrasi. Beberapa vaksin juga sangat sensitif terhadap dingin. Vaksin semacam itu akan kehilangan potensinya sepenuhnya jika dibekukan, meskipun yang lain dapat mempertahankan pembekuan tanpa kerusakan apa pun, oleh karena itu, sangat penting untuk mengetahui kondisi penyimpanan yang benar untuk setiap vaksin, dan untuk memastikan bahwa masing-masing disimpan selalu pada kondisi yang direkomendasikan. <sup>(12)</sup>

Pengujian mutu vaksin rabies di BBPMSOH masih terus ditingkatkan tiap tahun terhadap sampel vaksin rabies baik dari pendaftaran, sampling sewaktu-waktu, kiriman daerah dan pemantauan/pengkajian di lapangan. Pengujian mutu vaksin rabies yang berkelanjutan maka BBPMSOH terus berperan dalam program pengendalian dan pemberantasan rabies di Indonesia.

Selain vaksinasi, hal penting dalam pencegahan dan pengendalian rabies meliputi pendidikan publik yang berkelanjutan, kepemilikan hewan peliharaan yang bertanggung jawab, perawatan dan vaksinasi hewan rutin, dan pendidikan berkelanjutan profesional. Strategi pengendalian meliputi karantina, konfirmasi diagnosis, penentuan asal dan penyebaran wabah. Rabies selalu

merupakan penyakit virus yang mematikan dan mematikan yang hanya dapat dicegah, maka diperlukan upaya kolaboratif antara Dokter Hewan dan profesional perawatan kesehatan manusia dalam pencegahan dan pengendalian rabies <sup>(2)</sup>.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Hasil pengujian mutu vaksin rabies dari tahun 2011-2020 menunjukkan bahwa 275 dari 324 sampel (84.88%) yang diuji Memenuhi Syarat (MS) berdasarkan hasil rangkaian uji inaktivasi, uji keamanan dan uji potensi. Sampel vaksin rabies sebanyak 49 (15.12%) tidak memenuhi persyaratan (TMS).

Temuan sampel vaksin rabies TMS dapat disebabkan oleh proses inaktivasi virus tidak sempurna, penurunan mutu vaksin akibat proses produksi atau penerapan rantai dingin dalam penanganan distribusi dan peredaran vaksin yang tidak sesuai SOP dan stabilitas vaksin.

### Saran

Pengawasan peredaran mutu dan legalitas vaksin rabies yang beredar di Indonesia perlu ditingkatkan dengan lebih mengoptimalkan jejaring pengawasan obat hewan baik di tingkat pusat, provinsi dan kabupaten/kota.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam kegiatan pemantauan atau pengkajian mutu vaksin rabies, terutama pihak dinas provinsi dan kabupaten yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan yang telah memfasilitasi proses pengambilan sampel.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Baer. GM. 1991. The natural history of rabies. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press Inc. USA.
2. Chernet Balcha, Nejash Abdela. 2017. Review of Rabies Preventions and Control. International Journal of Public Health Science (IJPHS). Vol 6. No. 4. Pp. 313-350.
3. [DIRKESWAN] Direktur Kesehatan Hewan. 2021. Kebijakan Pengendalian & Pemberantasan Rabies di Indonesia. Webinar World Rabies Day BBV Wates 17 September 2021.
4. [DitjenPKH]. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI). Jilid 1. Edisi 5. Kementerian Pertanian.
5. [DitjenPKH]. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2019a. Masterplan Nasional Pemberantasan Rabies di Indonesia. Kementerian Pertanian.
6. [DitjenPKH]. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan. 2019b. Perencanaan Anggaran Kesehatan Hewan 2019 yang disampaikan pada Rakernas tanggal 15 Januari 2019 di Bogor.
7. Fooks ARkkk, Florence Cliquet, Stefan Finke, Conrad Freuling, Thiravat Hemachudha, Reeta S. Mani, Thomas Müller, Susan Nadin-Davis, Evelyne Picard-Meyer, Henry Wilde and Ashley C. Banyard. 2017. Rabies. Nature Reviews. Vol 3.
8. Lukas Bruckner, Klaus Cussler, Marlies Halder, Jacques Barrat, Peter Castle, Karin Duchow, Donna M. Gatewood, Richard Gibert, Jan Groen, Bernhard Knapp, Robin Levis, Catherine Milne, Simon Parker, Karin Stünkel, Nico Visser and Peter Volke. 2003. Three Rs Approaches in the Quality Control of Inactivated Rabies Vaccines The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 48<sup>1,2</sup>. ATLA 31. P 429-454.
9. Natih KKN, Yupiana Y, Hermawan D, Nuryani N, Djusa ER. 2011. Kualitas vaksin rabies yang beredar di Indonesia. Buletin Penyakit Zoonosis 11: 23-24.
10. [OIE]. *Office International des Epizooties*. 2008. Rabies. Chapter 2.1.13. OIE Terrestrial Manual. Paris: OIE.
11. Soedijar IL, Dharma DMN. 2005. Review Rabies. Prosiding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Puslitbang Peternakan.
12. [WHO]. *World Health Organization*. 1998. Safe vaccine handling, cold chain and immunization. A manual for the Newly Independent States. Global programme for vaccines and immunization. Expanded programme on immunization. Geneva: WHO.



## TINJAUAN ILMIAH TEKNIK LABORATORIUM UNTUK IDENTIFIKASI BAKTERI DAN UJI KEPEKAAN ANTIMIKROBA SECARA FENOTIPE DAN GENOTIPE

<sup>1</sup>Muhammad Zahid, <sup>2</sup>Puji Rahayu, <sup>3</sup>Riska Desitania, <sup>4</sup>Isnindar

<sup>1</sup>Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Jawa Barat, 16340

<sup>2</sup>Laboratorium Kimia dan Bioteknologi, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Peternakan, Bogor-Jawa Barat, 16161

<sup>3</sup>Laboratorium Residu Obat dan AMR, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Peternakan, Bogor-Jawa Barat, 16161

<sup>4</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak-Kalimantan Barat, 78124

<sup>1</sup>email: zahid.achmad@gmail.com

### ABSTRAK

Resistensi antimikroba telah berkembang menjadi salah satu masalah penting bagi kesehatan manusia dan hewan. Untuk itu diperlukan berbagai usaha dalam mengendalikan penggunaan antimikroba secara bijak. Uji identifikasi bakteri dan kepekaan antimikroba juga penting dilakukan dalam kaitannya kejadian resistansi antimikroba. Dalam tulisan ini dibahas mengenai isolasi bakteri dan teknik identifikasi bakteri sebagai bagian dari penyelidikan resistansi antimikroba dan selanjutnya dijelaskan metoda untuk uji kepekaan antimikroba secara fenotipe dan genotipe. Tinjauan ilmiah ini bertujuan memberikan pengetahuan dan pemahaman terkait isolasi bakteri dan teknik laboratorium yang digunakan untuk identifikasi bakteri dan uji kepekaan antimikroba terkait dengan resistansi antimikroba. Meskipun metoda molekular/genotipe dapat memberikan hasil yang lebih cepat dan akurat, akan tetapi membutuhkan biaya yang tinggi, bahan habis pakai yang mahal, dan keahlian untuk menganalisis dan menafsirkan hasil. Sementara metoda uji konvensional juga sangat dibutuhkan dan masih menjadi *gold standard* untuk memperoleh hasil fenotipe dan nilai konsentrasi hambatan minimum antimikroba.

**Kata kunci:** teknik laboratorium, identifikasi bakteri, uji kepekaan antimikroba, resistansi

### ABSTRACT

*Antimicrobial resistance has been evolving into a major concern for human and animal health. For this reason, various efforts needed to control the use of antimicrobials responsibly. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility tests are also important to perform in relation to the emergence of antimicrobial resistance. This paper discusses the identification technique of bacteria which is part of antimicrobial resistance study, further describes the methods for the antimicrobial susceptibility test by phenotype and genotype means. This scientific review aims to provide knowledge and understanding regarding laboratory techniques or testing methods applied for bacterial identification and antimicrobial susceptibility test related to antimicrobial resistance. Although the molecular/genotypic method can provide faster and more accurate results, however, this method is costly, requires expensive consumables, and expertise to analyze and interpret results. Meanwhile, the conventional technique is also equivalently needed and is still being the gold standard for obtaining phenotypic results and the minimum inhibition concentration value of antimicrobials.*

**Keywords:** laboratory technique, bacteria identification, antimicrobial susceptibility test, resistance

## LATAR BELAKANG

Statistik antibiotik global menyebutkan adanya peningkatan 35% dalam konsumsi antibiotik antara tahun 2000 dan 2010. Pada tahun 2015, industri antibiotik mencapai nilai USD 39,8 miliar. Rusia, India, Cina, Brasil, dan Afrika Selatan adalah negara penyumbang utama dengan diperkirakan ada 76% dari kenaikan konsumsi antibiotik<sup>(182)</sup>. Perubahan yang dialami dalam peningkatan konsumsi antibiotik selama dekade terakhir belum pernah terjadi sebelumnya, dan ini terutama akibat munculnya penyakit baru. Peningkatan konsumsi antibiotik diakibatkan penggunaan yang berlebihan atau penyalahgunaan dari antibiotik<sup>(3)</sup>.

Laporan WHO tahun 2016 menyebutkan ada sekitar 700.000 korban jiwa per tahun meninggal akibat resistansi antibiotik dan diprediksikan 10 juta per tahun pada 2050, menjadikan resistansi antibiotik penyebab kematian paling umum<sup>(14, 110, 143)</sup>. Selain itu, WHO juga telah memperingatkan sebelumnya terkait keparahan resistansi antibiotik, bahwa “resistansi mengancam pencapaian pengobatan modern, suatu era pasca-antibiotik - dimana infeksi umum dan luka ringan dapat membunuh - merupakan sesuatu yang sangat nyata pada abad ke-21”<sup>(107, 72)</sup>.

Resistansi antibiotik didefinisikan sebagai kemampuan genetik bakteri untuk menyalakan gen resistansi yang meniru efek penghambatan dari antibiotik untuk bertahan hidup<sup>(7)</sup>. Resistansi bisa terjadi secara intrinsik melalui rekombinasi alami dan integrasi ke dalam genom bakteri, atau dapat diperoleh melalui peristiwa mutasi gen horizontal seperti konjugasi, transformasi, dan transduksi<sup>(123, 60)</sup>. Peristiwa penting dalam pembentukan resistansi bakteri termasuk inaktivasi saluran porin, modifikasi target antibiotik, dan menetralkan efektivitas antibiotik melalui aksi enzimatis<sup>(112)</sup>. Demikian pemahaman tentang perubahan genetik dan

perubahan morfo-anatomi pada bakteri sangat penting untuk menangkal mekanisme resistansi.

Konsentrasi hambat minimum (KHM) dari berbagai uji kepekaan antimikroba (*antimicrobial susceptibility test*) dikategorikan oleh berbagai lembaga internasional. Pedoman KHM ini menentukan apakah antibiotik itu peka atau tidak. *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) menyediakan pedoman yang paling populer, yang didasarkan pada sifat farmakokinetik-farmakodinamik (PK-PD) dan mekanisme resistansi<sup>(105)</sup>. Sebagian besar negara Eropa mengikuti *cut-off MIC* berdasarkan sifat PK-PD, dan *epidemiological MIC cut-offs* (ECOFS) sebagaimana ditentukan oleh *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). *Breakpoint* KHM yang direkomendasikan oleh EUCAST umumnya lebih tinggi dari CLSI, sebagai contoh revisi dalam pedoman EUCAST, menyebabkan nilai resistansi ceftazidime lebih tinggi untuk *Klebsiella pneumonia* dan *Escherichia coli* penghasil ESBL dibanding yang tertera pada CLSI<sup>(132)</sup>.

Pengujian kepekaan antimikroba oleh laboratorium mikrobiologi klinis penting untuk memastikan kepekaan dalam memilih agen antimikroba secara empiris atau untuk mendeteksi resistansi pada isolat bakteri<sup>(99, 104)</sup>. Sering kali ditemukan bahwa hasil pengujian secara fenotipe memberikan kesimpulan suatu antimikroba sensitif terhadap bakteri, akan tetapi ternyata bakteri membawa banyak gen resistansi setelah dikonfirmasi secara genotipe. Dalam tulisan ini juga dibahas metoda AST secara fenotipe dan genotipe, termasuk isolasi dan teknik identifikasi bakteri sebagai bagian dalam melakukan investigasi terkait resistansi antimikroba.

Isolasi, pemurnian dan identifikasi bakteri adalah langkah pertama untuk studi kepekaan antimikroba. Isolasi dilakukan untuk mendapatkan biakan bakteri murni. Bakteri

biasanya diisolasi dari sampel feses, *caeca*, karkas, maupun produk makanan asal hewan dan pakan. Jumlah sampel yang diambil harus cukup dan mewakili untuk isolasi, sebagai contoh sampel feses harus dikoleksi paling tidak 5 gram dari sapi dan babi dan seluruh *caecum* dari unggas. Sementara untuk sampel pakan diambil paling sedikit 25 gram dan harus dikaitkan dengan program surveilans patogen yang ada <sup>(137)</sup>.

Memperoleh kultur bakteri murni adalah langkah pertama untuk identifikasi bakteri. Kultur murni sangat penting dalam studi morfologi, fisiologi, karakteristik biokimia, dan kepekaan terhadap agen antimikroba dari strain bakteri tertentu. Kultur murni paling baik diperoleh dengan menggunakan media padat, dengan metode pelat gores atau pelat tuang. Pelat coretan, jika dilakukan dengan benar, adalah metode yang paling praktis. Dalam metode pelat gores, satu lengkung inokulum ditempatkan di dekat pinggir pelat dengan media agar dan dioleskan atau digoreskan pada bagian atas pelat dengan guratan-guratan paralel yang tumpang tindih. Inokulum digoreskan pada bagian lain dari cawan sehingga koloni yang terisolasi dapat diamati pada area guratan terakhir <sup>(158)</sup>.

Kultur bakteri harus dijaga untuk studi selanjutnya dengan menyimpan di dalam media yang sesuai mempertahankan kultur bakteri. Metode yang paling sederhana adalah dengan subkultur atau dengan memindahkan organisme ke media padat segar yang memiliki kandungan nutrisi minimal untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang berlebihan. Bakteri dibiarkan tumbuh sebelum disimpan di lemari es atau ditutup dengan minyak parafin dan disimpan pada suhu kamar di tempat gelap. Metode sederhana lainnya adalah dengan pembekuan kultur bakteri, ditebar dalam media kaldu dengan gliserol. Gliserol ditambahkan untuk mencegah pengeringan bakteri sel.

Kultur bakteri juga dapat diawetkan dengan pengeringan beku atau liofilisasi. Di dalam metode ini, air dikeluarkan dari suspensi bakteri beku dengan sublimasi di bawah vakum <sup>(158)</sup>.

Isolasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan media umum, dimana berbagai bakteri dapat tumbuh, dan media selektif yang memungkinkan pertumbuhan genera tertentu. Contoh dari Media umum adalah *nutrient agar* (NA), *tryptic soy agar* (TSA), dan *brain heart infus agar* (BHIA). Contoh media selektif adalah *thiosulfate citrate bile sucrose agar* (TCBS) untuk vibrio, dan *glutamate strach phenol red agar* (GSP) untuk aeromonad dan pseudomonads. Media dilengkapi dengan 1-2% natrium klorida (NaCl) dan pH media kultur disesuaikan menjadi 7,2-7,4 dengan menambahkan 0,1 N NaOH <sup>(158)</sup>.

Kultur bakteri harus diberi label atau kode yang benar sebelum disimpan. Penting untuk memberi label pada tabung atau vial untuk menyimpan kultur bakteri dengan label yang tidak mudah terhapus. Label atau kode harus mencantumkan nomor referensi dan hal lain yang terkait informasi seperti sumber sampel (hewan inang, lokasi), tanggal isolasi, sifat khusus, identifikasi, nama orang yang mengisolasi organisme dan tanggal persiapan kultur stok<sup>(158)</sup>.

## II. TEKNIK IDENTIFIKASI BAKTERI

### 1. Pewarnaan Gram

Salah satu metoda tertua untuk identifikasi bakteri yang masih digunakan hingga saat ini adalah pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dapat menjadi langkah pertama yang berguna untuk memutuskan antimikroba mana yang akan diuji dalam situasi yang menuntut hasil cepat misalnya di laboratorium klinis. Metoda pewarnaan Gram dikembangkan oleh ahli mikrobiologi Denmark Hans Christian Gram pada tahun 1884, dan ditingkatkan dengan penambahan safranin *counterstain* oleh ahli mikrobiologi Jerman Carl Weigert <sup>(154)</sup>.

Pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan dua jenis bakteri berdasarkan komponen dinding sel mereka. Kristal violet ditambahkan ke dalam kaca preparat berisi bakteri, kemudian tambahkan iodium, dan selanjutnya membentuk kompleks kristal violet-iodium. Kemudian langkah dekolorisasi mencuci kompleks dari lapisan peptidoglikan tipis di dinding sel bakteri Gram negatif, akan tetapi kompleks tersebut menjadi terperangkap dalam lapisan peptidoglikan tebal di dinding sel bakteri Gram positif. *Counterstain* safranin ditambahkan, yang tidak memiliki efek yang terlihat pada bakteri Gram positif, yang akan tampak ungu di bawah mikroskop. Bakteri Gram negatif menjadi terwarnakan oleh safranin dan tampak merah muda di bawah mikroskop. Selain itu, bakteri dapat dibedakan berdasarkan morfologi saat pewarnaan strain Gram - *cocci* dalam tandan atau *string*, atau berbentuk batang<sup>(154)</sup>.

Hasil pewarnaan Gram dapat mendukung pengujian kepekaan dalam spesimen klinis yang mendesak seperti kultur darah, sebelum identifikasi lengkap dibuat. Di laboratorium klinis dan pengawasan, identifikasi lengkap harus dilakukan. Ini penting baik secara klinis, dan untuk analisis yang benar dari data sekuens, serta pengujian kepekaan<sup>(137)</sup>.

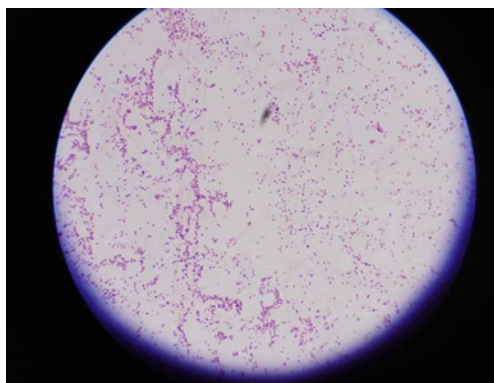
## 2. Kultur

Langkah pertama dalam identifikasi bakteri adalah kultur. Banyak bakteri memiliki morfologi

yang unik. Misalnya, koloni *Staphylococcus aureus* berdiameter 2-3mm, terangkat, dan berwarna kuning krem. *Pseudomonas aeruginosa* berukuran besar, pipih, dan memiliki kilau hijau metalik. Identifikasi dugaan dari kultur dapat memandu keputusan tentang metoda identifikasi berikutnya untuk digunakan, tetapi tidak dapat digunakan untuk memberikan jawaban yang pasti<sup>(74)</sup>.

## 3. Media Kromogenik (*Chromogenic media*)

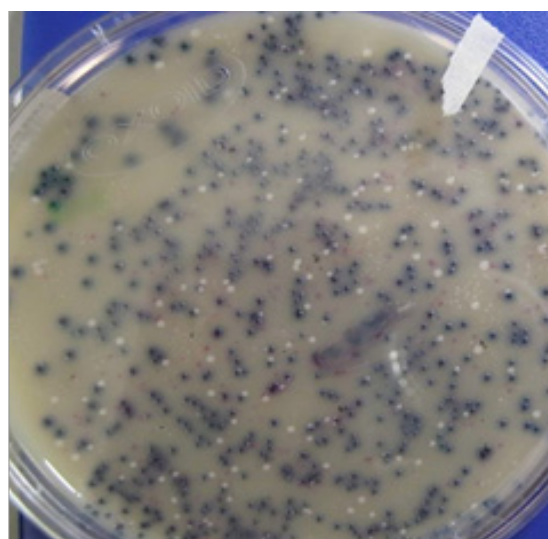
Lempeng agar kromogenik mengandung zat kromogenik yang dihidrolisis oleh enzim spesifik yang diproduksi oleh bakteri target, yang kemudian menghasilkan warna tertentu. Selain itu, agar kromogenik sering mengandung zat untuk menghambat pertumbuhan bakteri non-target, dan antibiotik untuk mendorong pertumbuhan hanya *strain* resistan. Lempeng kromogenik sangat berguna sebagai alat skrining untuk bakteri resistan, terutama dalam sampel dengan *load* bakteri tinggi, seperti apusan (*swab*) kulit atau sampel tinja<sup>(144)</sup>. Lempeng kromogenik dapat mengurangi beban kerja dengan memungkinkan teknisi memeriksa hanya bakteri yang diminati. Gambar 2 menunjukkan beberapa contoh media kromogenik. Meskipun berguna sebagai metoda skrining awal, identifikasi perlu dikonfirmasi menggunakan teknik lain karena media kromogenik tidak selalu spesifik<sup>(203)</sup>.



Gambar 1. Bakteri Gram positif berwarna ungu di bawah mikroskop<sup>(154)</sup>



(a)



(b)

Gambar 2. Lempeng kromogenik *Methicillin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA), dimana (a) adalah kultur murni, (b) adalah lempeng campuran langsung dari sampel klinis. Semua MRSA yang tampak memiliki warna biru tua. Bakteri lain juga dapat tumbuh, tetapi secara umum tidak akan tampak berwarna biru<sup>(8)</sup>

#### 4. Uji biokimia

Tes biokimiawi mendeteksi ada atau tidaknya gula atau enzim tertentu yang digunakan atau diproduksi oleh bakteri. Ini bisa menjadi metoda cepat dan murah untuk mengkonfirmasi identifikasi dugaan. Misalnya, koagulase diproduksi oleh *S. aureus* tetapi tidak oleh spesies *Staphylococcus* lainnya. Koagulase mengubah fibrinogen dalam plasma menjadi fibrin, dan dapat dideteksi menggunakan uji koagulase *slide/tabung* atau kit yang tersedia secara komersial. Oksidase dihasilkan oleh *Pseudomonas*, dan katalase dapat membedakan antara *Staphylococcus* (positif) dan *Streptococcus* (negatif). Tes biokimia dapat berguna untuk identifikasi dugaan, tetapi cenderung positif palsu dan negatif palsu, sehingga metoda identifikasi lebih lanjut direkomendasikan<sup>(158)</sup>.

Sistem otomatis tersedia untuk pengujian biokimia, dan ini sering dapat digunakan untuk identifikasi definitif, karena mereka menggunakan berbagai tes pada saat yang sama. Sistem otomatis seringkali memakan waktu beberapa jam atau semalam, dan bisa

mahal untuk dijalankan sehingga mungkin tidak cocok untuk sampel dalam volume tinggi.

#### 5. Teknik serologis

Teknik serologis seperti (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) atau *Nucleic Acid Amplification Technique* (NAAT) atau teknik amplifikasi asam nukleat dapat digunakan untuk mendeteksi antigen atau antibodi dalam serum dan jenis sampel lainnya. Contoh bakteri yang dapat dideteksi menggunakan metoda ini termasuk *Mycobacteria*<sup>(126)</sup>, *Legionella*<sup>(128)</sup> dan *Chlamydia trachomatis*<sup>(183)</sup>. Teknik serologis hanya dapat digunakan untuk sejumlah bakteri, dan membutuhkan reagen, peralatan, dan keahlian yang mahal.

#### 6. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS adalah teknik yang sekarang digunakan di banyak laboratorium klinis dengan kapasitas hasil yang tinggi. Menggunakan panas cepat, penguapan dan ionisasi analit dalam sampel yang kemudian dipisahkan oleh lamanya waktu yang dibutuhkan

untuk mencapai detektor. Spesies bakteri diidentifikasi oleh *fingerprint* massa peptida unik, yang dibandingkan dengan *database* yang ekstensif. Spektrometer massa MALDI-TOF sangat mahal, tetapi sangat ekonomis untuk dijalankan, dan dapat memberikan hasil dalam hitungan menit. MALDI-TOF MS dibatasi untuk bakteri tertentu yang terkait erat, misalnya tidak dapat membedakan antara spesies *Shigella* dan *E. coli*, meskipun perbaikan terus dilakukan<sup>(108)</sup>.

#### 6. Metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metoda molekuler seperti PCR, berguna untuk mengidentifikasi bakteri yang sulit atau lambat tumbuh dalam kultur, seperti *Mycobacterium*. DNA diekstraksi dari organisme (atau sampel yang diduga mengandung organisme), kemudian ditambahkan primer. Primer adalah sekuens pendek DNA yang akan mengikat ke salah satu ujung target DNA dalam sampel DNA bakteri. Beberapa salinan wilayah target ini dibuat (amplifikasi), yang kemudian dapat dideteksi menggunakan teknik seperti elektroforesis gel. Wilayah target DNA yang akan dideteksi biasanya gen yang spesifik untuk spesies bakteri tertentu, atau gen resistansi antibiotik. PCR relatif murah, tetapi bisa memakan waktu. Saat melakukan proses amplifikasi risiko kontaminasi tinggi, oleh sebab itu sangat diperlukan kehati-hatian saat mempersiapkan DNA<sup>(178)</sup>.

#### 7. Metoda Sekuensing/*Sequencing*

*Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) membandingkan sekuens DNA dari beberapa gen untuk mengklasifikasikan strain spesies tertentu. Meskipun sebelumnya sering digunakan, MLST tidak dapat membedakan antara strain terkait erat dari spesies yang sama. *Whole Genome Sequencing* (WGS) adalah teknik yang sangat baik dalam mendeteksi resistansi antimikroba<sup>(21)</sup>. Selain identifikasi spesies, WGS dapat digunakan untuk mengidentifikasi gen resistan dan transmisi dalam keadaan wabah<sup>(150)</sup>. Sekuensing WGS telah maju pesat dalam beberapa dekade terakhir, akan tetapi metode ini membutuhkan biaya yang besar dalam pengoperasiannya serta keahlian untuk analisis dan interpretasi meskipun alat otomatis baru sedang dikembangkan. Salah satu alat yang digunakan untuk sekuensing DNA seperti Gambar 3<sup>(18)</sup>.

### III. UJI KEPEKAAN ANTIMIKROBA SECARA FENOTIPE

#### 1. Metoda Difusi Cakram (*Disc Diffusion Method*)

Pengujian kepekaan antimikroba dilakukan untuk mendeteksi resistansi antimikroba dan menentukan antimikroba yang sesuai untuk digunakan dalam pengobatan. Ada banyak metoda uji kepekaan antimikroba, yang paling sederhana dan paling hemat



Gambar 3. Alat *Illumina MiniSeq sequencer*<sup>(8)</sup>

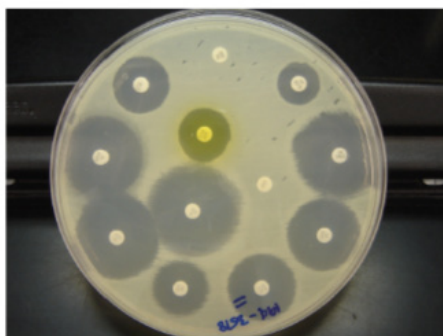
biaya adalah metoda difusi cakram. Metoda ini telah digunakan sejak 1950-an dan masih merupakan metoda yang paling umum digunakan saat ini. Metoda ini merupakan *gold standard* untuk mengetahui kepekaan bakteri. Difusi cakram diperkenalkan oleh eksperimen Bauer dan Kirby pada tahun 1956. Koloni bakteri yang diisolasi dipilih, disuspensikan ke dalam media pertumbuhan, dan distandarisasi melalui uji kekeruhan, dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/mL. Tujuan dari prosedur ini adalah untuk menentukan apakah bakteri peka atau resistan terhadap berbagai antibiotik yang berbeda. Hal ini dilakukan dengan melapisi suspensi standar dari organisme ke lempeng agar yang sesuai, dan kemudian menggunakan cakram antibiotik ke permukaan lempeng sebelum inkubasi. Lempeng diperiksa pada hari berikutnya untuk bukti pertumbuhan (27,40,90,31,33, 99).

Jika bakteri resistan terhadap antimikroba, ia akan dapat tumbuh di sekitar cakram. Jika peka, bakteri tidak akan dapat tumbuh di dekat cakram dimana antimikroba ada. Area di sekitar cakram di mana tidak ada pertumbuhan disebut zona penghambatan. Diameter zona hambatan dibandingkan dengan titik *cut-off* di mana bakteri dianggap resistan (jika zona lebih kecil dari titik *cut-off*) atau peka (zona lebih besar dari titik *cut-off*). Titik batas/*cut-off* ini (juga dikenal sebagai *breakpoint* klinis/*clinical breakpoints*) diterbitkan oleh berbagai badan pengawas, dan ada beberapa tabel *breakpoint* yang tersedia untuk panduan. Sebagai salah

satu contohnya adalah EUCAST. *Breakpoint* dari Pedoman EUCAST merupakan akses terbuka dan tersedia secara bebas untuk semua orang. Pedoman ini diperbarui secara berkala sehingga harus dipastikan menggunakan versi terbaru (49).

Tabel EUCAST juga menyediakan media yang direkomendasikan dan kondisi pertumbuhan untuk bakteri yang berbeda, bersama dengan organisme kontrol yang direkomendasikan. EUCAST menggunakan banyak sumber untuk menentukan *breakpoint*, termasuk dosis, farmakokinetik, mekanisme resistansi, distribusi KHM, distribusi diameter zona, farmakodinamik, dan nilai batas epidemiologis (*Epidemiological Cut-Off Values/ECOFFs*). Diameter zona diukur dan dibandingkan dengan nilai *cut-off* resmi untuk isolat yang peka (*susceptible*), menengah (*intermediate*) dan resistan (*resistant*) (50).

Pemilihan cakram yang dipilih untuk pengujian kepekaan akan tergantung pada organisme yang diuji, pedoman yang digunakan (dalam hal ini, EUCAST), dan kebijakan resep antibiotik lokal apapun, misalnya antibiotik mana yang ingin diresepkan oleh seorang dokter untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh organisme tertentu. Keuntungan metoda difusi cakram diantaranya relatif murah dan mudah dilakukan, namun kadang-kadang menghasilkan nilai KHM yang sedikit kurang akurat (149).



Gambar 4. Uji difusi cakram dengan *isolate E. coli* dari kultur urin. Diameter dari semua zona hambatan diukur dan diterjemahkan ke dalam kategori peka, intermediet, atau resistan menggunakan tabel CLSI / EUCAST versi terbaru (100)

Ada keterbatasan pada metode difusi cakram antara lain hasil tidak terduga, membutuhkan metode pengujian lain untuk konfirmasi atau mungkin diperlukan pengujian ulang. Meskipun metode ini banyak digunakan untuk pengujian kerentanan antimikroba, metode difusi cakram tidak berlaku untuk beberapa organisme. Berikut ini adalah contoh organisme yang metode difusi cakram tidak dapat diterapkan:

1. Mikroorganisme yang rewel, tumbuh lambat atau memiliki persyaratan pertumbuhan khusus tidak dapat diuji dengan metode difusi cakram
2. Uji kepekaan mikobakteri dan jamur memerlukan teknik khusus yang biasanya hanya tersedia di laboratorium rujukan
3. Teknik khusus mungkin diperlukan untuk mendeteksi *Streptococcus pneumoniae* yang resisten terhadap penisilin, *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap *methicillin*, dan *Enterococcus faecalis* yang resisten terhadap aminoglikosida<sup>(40, 91)</sup>.

Selain itu, metode difusi cakram kurang sesuai untuk antibiotik yang memiliki sifat fisiokimia molekul yang spesifik, contohnya vankomisin, kolistin, dan makrolida seperti klaritromisin memiliki berat molekul yang lebih tinggi dan oleh karena itu berdifusi sangat lambat dalam agar. Difusi terbatas dan gradien konsentrasi yang tidak terselesaikan dengan baik di sekitar cakram tersebut menghasilkan hanya beberapa milimeter perbedaan ukuran zona antara galur/*strains* yang rentan dan yang resisten, yang dapat menghasilkan pembacaan yang berpotensi ambigu. Hasil juga dapat dipengaruhi oleh posisi sumber cahaya di piring. Pelat sering dibaca dengan menggunakan cahaya yang dipantulkan, dengan pengecualian linezolid, oksasilin, dan vankomisin untuk spesies *S. aureus* dan *Enterococcus*. Dalam kasus ini, zona hambat harus diukur dengan

menggunakan cahaya yang ditransmisikan untuk memastikan pengukuran diameter zona yang akurat. Jika hasilnya tidak terduga atau terbatas, metode pengujian lain mungkin diperlukan atau pengujian harus diulang untuk konfirmasi<sup>(40, 91)</sup>.

Kemunculan berbagai instrumen untuk menganalisis zona hambatan telah ditambahkan untuk keandalan hasil difusi cakram dengan mengurangi variabilitas karena penanganan oleh operator dan penafsiran/interpretasi. Kamera atau pemindai/*scanner* pengambil gambar, dan perangkat lunak analisis gambar yang terpasang menampilkan zona hambatan dan membandingkan hasil yang diperoleh dengan berbagai pedoman yang adadi database. Accuzone (*AccuMed International, Hillsboro, Oregon, AS*), Biomik (*Giles Scientific, Santa Barbara, California, AS*), *Mastscan Elite* (Mast, Bootle, UK), dan Sirscan (*Becton Dickinson, Oxford, UK*) adalah beberapa instrumen yang mampu menganalisis zona hambatan tetapi semuanya memiliki perbedaan dalam input data, analisis, kemudahan penggunaan, dan penyajian hasil<sup>(52)</sup>.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan terkait penggunaan metoda difusi cakram, antara lain: Membaca hasil<sup>(26)</sup>

- 1) Periksa lempeng setelah inkubasi. Inokulum yang benar harus menghasilkan pertumbuhan yang rapat. Koloni individu organisme resistan dapat diamati di sekitar beberapa cakram antimikroba, akan tetapi jika masing-masing koloni tersebar di seluruh lempeng, inokulum terlalu ringan dan sampel perlu diuji ulang.
- 2) Periksa apakah zona itu bulat; tidak oval, cacat atau memiliki tepi yang bergerigi.
- 3) Margin zona harus dipertimbangkan sebagai area yang tidak menunjukkan pertumbuhan yang jelas dan terlihat yang dapat dideteksi dengan mata tanpa bantuan. Jika tidak



dapat mengukur diameter karena ukuran zona yang sangat besar, ukur jari-jari dari tengah cakram dan kalikan dengan 2. Jika tidak ada hambatan (pertumbuhan tampak/muncul hingga batas cakram), maka diameter cakram harus dicatat (6mm).

B. Keterbatasan prosedur<sup>(20,95,196)</sup>

- 1) Pengujian difusi cakram, seperti pengujian kepekaan antimikroba lainnya, adalah penentuan kepekaan antimikroba secara *in vitro*. Hasil *in vitro* ini mungkin tidak selalu berkorelasi dengan *in vivo*. Selain itu, agen antimikroba dengan efikasi klinis terbatas (aminoglikosida terhadap *Salmonella* dan *Shigella*) atau antimikroba yang dilarang (kloramfenikol pada hewan produksi) sering memberikan penanda yang berharga untuk fenotipe resistansi spesifik dan masih termasuk dalam banyak panel kepekaan.
- 2) Pengujian kepekaan mikroorganisme dengan difusi cakram harus dilakukan pada kultur murni. Namun, indikasi (ukuran zona yang tidak dapat dilaporkan) dapat diperoleh meskipun biakannya tidak murni. Untuk mendapatkan hasil yang benar, lakukan subkultur yang diuji dan uji kembali.
- 3) Variasi konten dalam agar *Mueller-Hinton* dapat menyebabkan masalah seperti hasil abnormal untuk antibiotik tertentu dan spesies bakteri. Setiap betas media baru harus dievaluasi dan strain kontrol selalu disertakan.
- 4) Pengujian difusi cakram tidak cocok untuk beberapa antibiotik, seperti Vankomisin untuk *S.aureus*. Dalam hal ini, tes KHM harus dilakukan sebagai gantinya.

C. Pengawasan Mutu (*Quality Control/QC*)

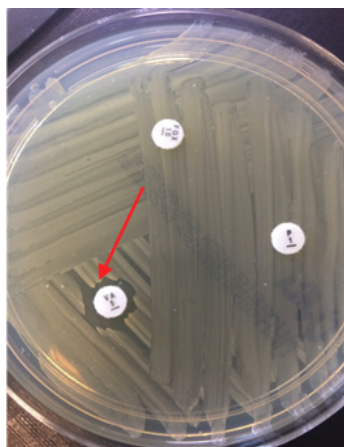
(32,93, 94, 29, 28, 92,133, 91,134)

- 1) Pengujian AST biasanya merekomendasikan *strains* QC yang diatur secara internal maupun oleh standar internasional, seperti ISO 20776-2: 2007.
- 2) Proses QC tergantung pada ketersediaan *strain* QC dan kondisi kultur, metoda AST dan *breakpoint* untuk antibiotik yang berbeda seperti yang ditentukan dalam standar.
- 3) *Strain* QC dapat dibeli/diperoleh dari penyedia komersial seperti ATCC, Manassas VA USA, NCTC, London UK dan Oxoid, BD. *Strain* QC untuk menguji antibiotik yang paling umum atau pola resistansi yang ditemui harus tersedia.
- 4) Kondisi penyimpanan *strain* standar penting untuk memastikan viabilitas *strain* dan pemeliharaan fenotipe resistansi. *Strain* dapat disimpan dalam *aliquot* yang dibekukan sebagai stok gliserol pada -70°C (5 tahun) atau -130°C (> 5 tahun) atau dikeringkan/diliofilisasi dan disimpan pada 2-8°C. Stok segar harus dihidupkan kembali dari stok beku untuk mencegah melebihi lima pasase dari stok bakteri awal.
- 5) Sebelum melakukan AST pada isolat uji, *strain* kontrol harus telah diuji dan memenuhi *breakpoint* yang ditentukan dalam kondisi yang digunakan untuk pengujian rutin.
- 6) Sumber kesalahan umum yang menyebabkan *strain* QC gagal dalam tes QC umumnya meliputi: <sup>(134)</sup>
  - a. Inokulum yang terlalu terang atau terlalu tebal (lihat Gambar 5 hingga 7);
  - b. Inokulum /kultur campuran yang terkontaminasi (lihat Gambar 5);
  - c. Kesalahan pengukuran zona menggunakan batas zona yang salah atau alat atau kondisi pencahayaan yang salah;

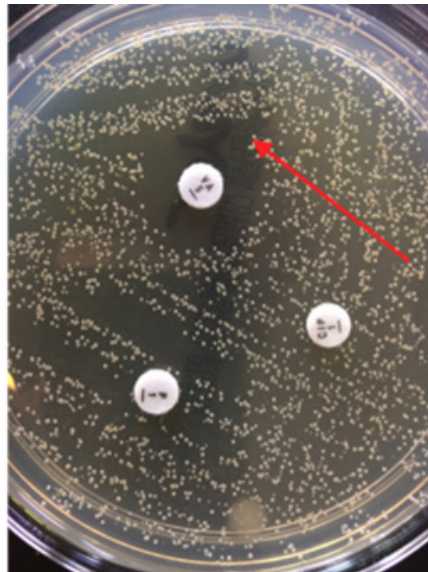
- d. Media lempeng terlalu tipis atau tebal, ini memengaruhi difusi obat melalui media dan memengaruhi ukuran zona;
- e. Media yang digunakan salah atau penggunaan media tidak sesuai standar, termasuk suplemen media untuk setiap spesies bakteri/kombinasi antibiotik tidak dicatat dengan cermat;
- f. Persiapan media yang buruk menyebabkan komposisi media atau pH yang salah.
- g. Cakram yang salah, kedaluwarsa, rusak, atau salah letak/taruh.
- h. Posisi relatif cakram pada lempeng dapat memengaruhi ukuran zona karena beberapa obat memiliki efek sinergis atau antagonis satu sama lain ketika diletakkan berdekatan di piringan.



Gambar 5. Lempeng ini menunjukkan inokulum yang terlalu terang dan memiliki dua jenis koloni: satu koloni besar dan koloni kecil lainnya (panah merah) menunjukkan pertumbuhan campuran. Inokulum yang tidak rata dan ringan menghasilkan zona hambatan yang lebih besar dan pertumbuhan campuran menghasilkan batas yang tidak jelas. Kedua kesalahan menyebabkan pengukuran penghambatan dan kesalahan dalam interpretasi resistansi/kepekaan antibiotik<sup>(8)</sup>



Gambar 6. Lempeng ini menggambarkan inokulum yang terlalu tebal. Tepi zona hambatan menandai dimana konsentrasi antibiotik tidak dapat mencegah pertumbuhan bakteri. Ketika pertumbuhan bakteri terlalu tebal konsentrasi ini lebih tinggi dan zona penghambatan berkurang membuat bakteri tampak lebih resistan daripada sebenarnya. *Strain* ini harus peka terhadap vankomisin tetapi karena pertumbuhan berlebih jadi terlihat resistan<sup>(8)</sup>

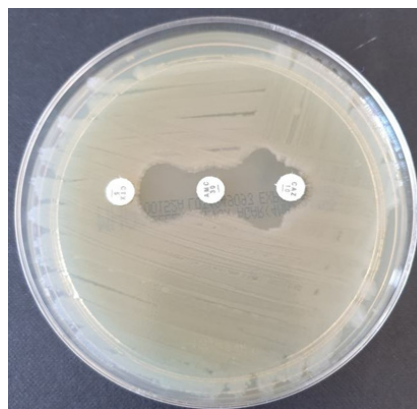


Gambar 7. Ilustrasi sebuah lempeng dimana inokulum terlalu tipis. Jika inokulum bakteri tidak rata maka zona hambatan tidak dibatasi dengan jelas dan tidak dapat diukur secara akurat dan lebih besar dari yang diharapkan. Panah menunjukkan di mana tepi zona tidak jelas, sehingga tidak akan mudah untuk mengukur secara akurat <sup>(8)</sup>

## 2. Tes Konfirmasi ESBL Sinergi Cakram Ganda/Double Disc Synergy Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) Confirmation Test

Metoda ini merupakan pengembangan dan diadopsi dari metoda difusi cakram. Apabila dalam pengujian kepekaan difusi cakram pada pengukuran *E. coli* menunjukkan resistansi terhadap sefalosporin dan diduga bahwa strain mengkode ESBL, maka perlu dilakukan tes konfirmasi. Contoh lain seperti untuk mencari perluasan zona hambat sefalosporin yang berdekatan dengan cakram yang mengandung co-amoxiclav (20 µg amoxicillin + 10 µg asam

klavulanat). Perluasan > 5 mm atau 50% menunjukkan produksi ESBL. Teknik ini umumnya dapat diandalkan untuk mendeteksi ESBL pada spesies *E. coli* dan *Klebsiella* tetapi memiliki kelemahan bahwa jarak optimal antara cakram bervariasi dengan *strain*, yang berarti bahwa beberapa tes pasti akan dilakukan dengan jarak sub-optimal untuk deteksi ESBL. Tes ini tidak ideal untuk spesies *Enterobacter*, *Citrobacter* atau *Serratia*, yang mungkin memiliki beta-laktamase AmpC yang dapat diinduksi; ini dapat diinduksi oleh klavulanat, menginduksi resistansi terhadap klavulanat, menghilangkan sinergi ESBL yang muncul <sup>(106)</sup>.



Gambar 8. Contoh tes sinergi cakram ganda positif. Perluasan zona terlihat di antara cakram <sup>(8)</sup>

### 3. Metoda Dilusi (*Macrodilution/Microdilution Method*)

Dilusi/pengenceran adalah salah satu cara paling awal dalam praktik mikrobiologi, yang diperkenalkan pada awal tahun 1870-an, dan memungkinkan pertumbuhan dan identifikasi populasi bakteri dalam suspensi<sup>(68)</sup>. Pasteur, Lister, Koch, dan Ehrlich terdaftar sebagai pelopor di bidang bakteriologi, dan mereka bekerja tentang konsep makrodilusi<sup>(157)</sup>. William Roberts dan John Tyndall lebih jauh berkontribusi pada metoda *macrodilution* dan mengamati pertumbuhan bakteri dalam media yang diencerkan<sup>(148)</sup>. Dua tipe dasar pengenceran adalah mikrodilusi dan makrodilusi, dimana *broth* dan agar adalah media yang paling umum digunakan. Dalam pengenceran *broth*, pengenceran dua kali lipat berturut-turut (1, 2, 4, 8, dan 12  $\mu\text{L}$ ) dari antibiotik dibuat dan ditempatkan ke dalam tabung sentrifugal mikro yang berisi media pertumbuhan bakteri, diikuti dengan membuat volume akhir dengan menambahkan media dan diinkubasi semalaman pada suhu 35°C. Terakhir, pemeriksaan pertumbuhan dilakukan untuk menetapkan *breakpoint* melalui kekeruhan kultur media. Dalam pengenceran agar, antibiotik diencerkan ke dalam media agar, diikuti dengan pembuatan lempeng (*plate formation*) dan penggunaan sel bakteri ke permukaan lempeng agar.

Pada awal abad ke-20, berbagai ilmuwan melakukan upaya untuk memperkenalkan pengenceran berseri. Mereka mengatur faktor pengenceran dalam hal perkembangan geometris, dan menurunkan persamaan matematika umum untuk menafsirkan hasil pengenceran<sup>(100, 145,125, 152,65, 53)</sup>. Pada tahun 1929, Alexander Fleming melakukan teknik pengenceran serial untuk memahami aktivitas antibiotik. Dalam teknik ini, pengenceran antibiotik dua kali lipat dicampur dengan media cair pra-inokulasi untuk menentukan tindakan

antibiotik dengan memeriksa kekeruhan. Pada tahun 1942, Fleming memodifikasi protokol sebelumnya dengan menggunakan pH sebagai pengganti kekeruhan untuk mengidentifikasi aktivitas antibakteri. Dalam tahun yang sama, Rammelkamp dan Maxon memperkenalkan pengenceran makro *broth*, atau "*tube dilution method*", yang dianggap sebagai metoda pengenceran standar untuk kedua KHM dan AST. CLSI merekomendasikan pedoman untuk mengatur *breakpoint*. Upaya pertama terkait AST telah dilakukan oleh Schmith dan Reymann menggunakan media agar selama tahun 1940-an<sup>(41)</sup>.

*Microdilution* adalah prototipe miniatur dari metoda makrodilusi dimana kepekaan pengujian dilakukan pada 96-well *microtiter plate* sekali pakai, dimana setiap *well* memiliki kapasitas sampel ~ 0,1 mL. Metoda ini merupakan *gold standard* EUCAST untuk penentuan KHM<sup>(26,30)</sup>. Untuk mencampur sampel ke dalam *microwells*, *dispenser*/pencampur mekanis digunakan untuk menghindari kesalahan penanganan. Setelah inkubasi semalaman, pertumbuhan dan KHM dinilai melalui instrumen optik khusus. Metoda ini telah distandarisasi dengan baik untuk sebagian besar bakteri yang sulit ditangani. Jumlah koloni yang digunakan untuk *broth dilution* adalah  $5 \times 10^4$  CFU/ *well*, sedangkan untuk *agar dilution* jumlah koloni adalah  $10^4$  CFU per spot<sup>(33, 153)</sup>.

Kelemahan utama dari metoda dilusi adalah persyaratan volume reagen yang besar. Selain itu, ruang percobaan, langkah pengenceran yang panjang dan berulang (untuk *macrodilution*), kemungkinan hasil positif palsu karena waktu inkubasi yang lama<sup>(189)</sup>, kemungkinan kontaminasi silang, ketidakcocokan bakteri untuk pertumbuhan, dan ketidakmampuan membedakan bakteri yang hidup (*viable*) dan yang tidak dapat hidup (*nonviable*). Tantangan lain pada metoda ini adalah mempertahankan parameter pengujian

optimal yang direkomendasikan seperti pH, suhu, media, dan lama inkubasi dan lempeng viabilitas kontrol (*control viability plate*) adalah wajib (*mandatory*) diperlukan dalam pengujian untuk mencapai hasil yang baik <sup>(35)</sup>.

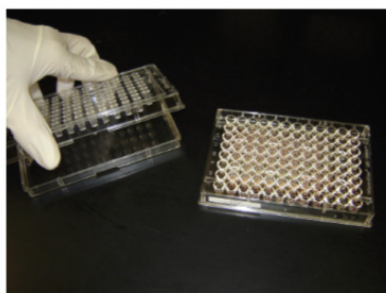
#### 4. Metoda *Etest* (*Epsilon*meter Test)

*Etest* adalah strip kertas penyerap yang mengandung konsentrasi antibiotik yang semakin tinggi di sepanjang jalur kertas penyerap tersebut. Pertumbuhan bakteri di sepanjang jalur akan berhenti pada KHM antibiotik itu untuk isolat itu <sup>(17)</sup>.

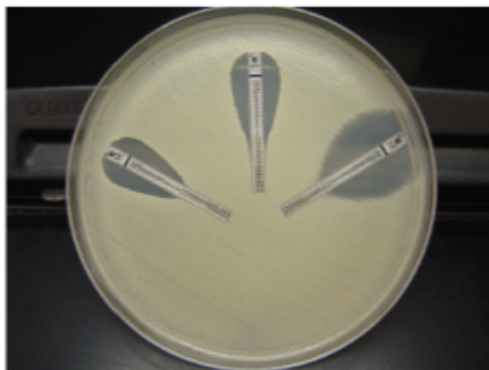
Metoda ini merupakan pengembangan teknik yang signifikan untuk analisis rutin resistansi antibiotik yang tersebar luas pada bakteri, yang dikembangkan oleh Bolmström dan Eriksson pada akhir 1980-an. Pada tahun 1991, AB BIODISK memproduksi strip plastik *Etest* pertama yang mendeteksi berbagai antibiotik pada satu platform (Gambar 2) <sup>(146)</sup>. Strip plastik *Etest* dilapisi dengan konsentrasi antibiotik yang telah ditentukan sebelumnya, dankisaran KHM interpretatif yang sesuai masing-masing ditandai pada permukaan dan belakang strip. Untuk deteksi, beberapa strip ditempatkan pada cawan agar yang telah diinokulasi sebelumnya, diikuti dengan inkubasi semalam; zona penghambatan *elips* muncul di sekitar strip, menunjukkan KHM dititik persimpangan antara zona hambat dan tepi strip <sup>(162)</sup>. Kesederhanaan, akurasi, dan keandalan *Etest* membuat FDA menyetujui *Etest* untuk dikomersialisasikan <sup>(101)</sup>. Kemampuan interpretasi KHM yang nyaman di bawah

beragam kondisi fisik membuat *Etest* menjadi metoda preferensial/disukai daripada teknik difusi dan pengenceran cakram terstandar di laboratorium klinis untuk AST <sup>(159)</sup>.

Pada 1990-an, serangkaian studi banding dengan teknik standar lainnya, misalnya, pengenceran dan difusi agar, pengenceran *broth*, dan *Etest*. Banyak strain dari *H. pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus spp.*, dan banyak isolat klinis lainnya telah diuji oleh *Etest* dan dibandingkan dengan metoda standar, menghasilkan korelasi yang baik dalam kisaran 91%-99% <sup>(184)</sup>. Baru-baru ini, tahun 2016, MSSA dan MRSA diperiksa dengan *Etest* untuk menentukan KHM dari ceftaroline. Hasil dibandingkan dengan *broth microdilution* (BMD) dan menunjukkan kesesuaian yang sangat baik lebih dari 95% <sup>(17)</sup>. Berbagi kultur dari *Campylobacter spp.* terhadap tujuh antibiotik juga dievaluasi oleh *Etest* untuk menentukan resistansinya <sup>(71)</sup>. Semua hasil ini menunjukkan keandalan dan pentingnya dari *Etest* dalam mengevaluasi KHM dari berbagai antibiotik terhadap metoda standar saat ini, terutama untuk bakteri yang tumbuh lambat seperti *Campylobacter jejuni*, *H. pylori* dan bakteri yang sulit ditangani seperti *S. pneumoniae* dan *Neisseria spp.* Salah satu keuntungan signifikan dari *Etest* adalah sensitivitasnya, yang bisa mendeteksi ESBL, bahkan dalam jumlah kecil <sup>(51)</sup>. Selain itu, strain resistansi secara akurat dapat dengan mudah dihitung di laboratorium/rumah sakit karena konsentrasi gradien dari antibiotik yang stabil yang ditandai pada strip *Etest*.



Gambar 9. Panel *broth microdilution* mengandung 98 reagent wells dan *disposable tray inoculator* <sup>(99)</sup>



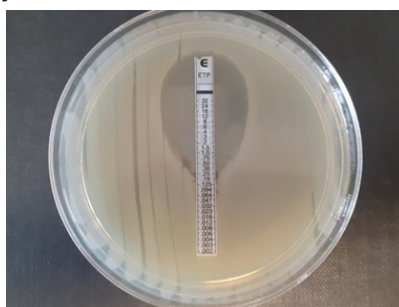
Gambar 10. Isolat *S.aureus* diuji dengan metoda difusi *gradient Etest* dengan vancomycin (VA), daptomycin (DM), and linezolid (LZ) pada *Mueller-Hilton* agar. KHM dari tiap zat aktif ditentukan oleh titik potong/temu (*intersection*) dari pertumbuhan organisme dengan strip diukur menggunakan skala yang tertulis di atas strip <sup>(99)</sup>

Contoh lain dari aplikasi metoda ini adalah untuk deteksi kelas antibiotik karbapenem, yang meliputi meropenem, imipenem dan ertapenem dan merupakan salah satu opsi yang digunakan terhadap ESBL<sup>(132)</sup>. Resistansi terhadap karbapenem telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Bakteri yang resistan terhadap karbapenem terdaftar sebagai 'Prioritas 1, kritis/*critic*' di WHO yang tercantum dalam *global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics* <sup>(200)</sup>.

Karbapenemase bukan satu-satunya mekanisme resistansi yang didapat terhadap karbapenem tetapi merupakan yang paling penting dari perspektif kesehatan masyarakat. Semua karbapenem adalah substrat untuk semua karbapenemase, tetapi tingkat resistansi rendah, mempersulit deteksi dan interpretasi. Kepekaan dapat menjadi batas, sehingga setiap isolat yang menunjukkan kepekaan/resistansi yang rendah selama pengujian cakram

harus dikonfirmasi menggunakan metoda alternatif. Konfirmasi juga harus dilakukan jika menggunakan agar selektif kromogenik komersial/*commercial chromogenic selective agar* <sup>(144,196)</sup>.

EUCAST merekomendasikan penggunaan meropenem sebagai indikator karbapenem karena menawarkan kompromi terbaik antara sensitivitas dan spesifisitas. Meskipun ertapenem memiliki sensitivitas yang lebih besar (lebih sedikit negatif palsu), tetapi tidak direkomendasikan karena memiliki spesifisitas yang buruk (positif palsu lebih tinggi) untuk penghasil karbapenemase. Meskipun ada tes konfirmasi yang tersedia secara komersial (seperti tes cakram kombinasi/ *combination disc test*), EUCAST merekomendasikan bahwa penentuan KHM adalah satu-satunya tes yang diperlukan. Ini dapat dilakukan dengan agar/ *broth microdilution*, atau dengan *gradient strip* seperti yang dijelaskan di bawah ini.



Gambar 10. Contoh lain tes strip gradien. KHM ertapenem (ETP) dibaca pada titik dimana tidak ada pertumbuhan bakteri lebih lanjut di sepanjang jalur strip, dalam hal ini pada konsentrasi 0,19 mg/L<sup>(8)</sup>

Selain beberapa kelebihan, ada beberapa keterbatasan dari *Etest*, yaitu ketidakakuratan dan ketidakkonsistensian untuk agen antibakteri tertentu, seperti penisilin, siprofloksasin, ofloksasin, dan rifampisin<sup>(58)</sup>. Kelemahan lain dari *Etest* yang membuatnya menjadi rumit untuk analisis uji rutin adalah antibiotik yang peka terhadap pH, kinerja tests yang mahal, penyimpanan strip, dan pengaturan laboratorium untuk inokulasi dan inkubasi lempeng yang tepat<sup>(4, 101)</sup>.

#### 5. Uji lateks

*Penicillinase-resistant penicillins* (PRPs) sering digunakan untuk mengobati *Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA) yang peka terhadap methicillin. *Penicillin-Binding Protein2a* (PBP2a), yang dikodekan oleh gen *mecA* dalam MRSA, mengurangi kepekaan terhadap PRPs<sup>(130)</sup>. Oleh karena itu adanya PBP2a adalah indikator yang baik untuk resistansi metisilin<sup>(187,185)</sup>. Tes lateks komersial dapat digunakan untuk mendeteksi PBP2a. Partikel lateks mengandung antibodi untuk PBP2a, sehingga setiap PBP2a yang ada dalam sampel akan mengikat partikel lateks, menyebabkan aglutinasi seperti yang terlihat di Gambar 11.

#### 6. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS, diperkenalkan pada tahun 2000, adalah metoda sensitif lainnya untuk identifikasi bakteri. Sensitivitas dan akurasi yang tinggi adalah karakteristik utama yang menjadikannya metoda yang berguna untuk klinis. Berbagai macam penelitian mengungkapkan signifikansinya dalam membedakan MRSA, MSSA, dan strain bakteri lainnyadimana bakteri yang peka dan resistan telah dievaluasi melalui analisis puncak spektral. Bahkan perbedaan halus dalam profil ekspresi telah diperhatikan pada *strain isogenic* dari *S. aureus*<sup>(75)</sup>. Efisiensi MALDI-TOF MS telah diteliti lebih lanjut pada *Enterococci* yang resistan terhadap vankomisin, dimana sensitivitas lebih tinggi dari 90% telah dicatat. Selanjutnya dilakukan analisis beberapa target dengan *strain resistan* yang berbeda dari *Pseudomonas spp.* terhadap siprofloksasin, tobramisin, dan meropenem telah diidentifikasi secara efisien<sup>(102)</sup>. *MALDI Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA)* yang baru dikembangkan adalah modulasi MALDI-TOF MS yang lebih mudah dan hemat biaya yang



Gambar 11. Uji Lateks untuk deteksi *Penicillin-Binding Protein2a* (PBP2a)<sup>(8)</sup>

digunakan untuk penentuan AST dan KHM <sup>(206)</sup>. Terlepas dari semua keunggulan MALDI-TOF MS, harga instrumen dan perawatannya yang sangat mahal untuk aplikasi massal.

### 7. Cytometry dengan *Bacterial Fluorescence Probes*

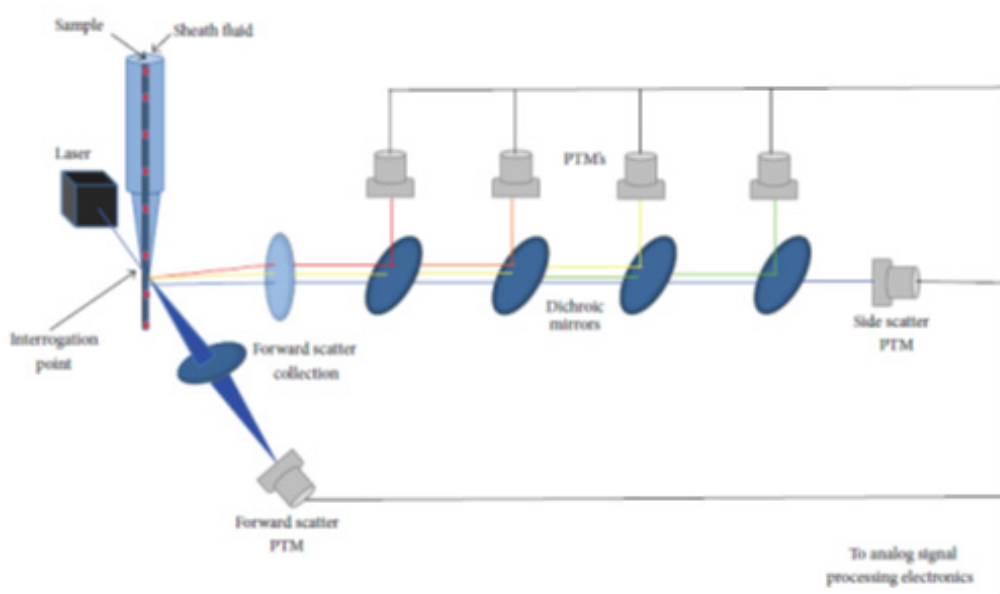
*Flow cytometry* merupakan prosedur analitik pengukuran cepat hamburan cahaya dan emisi fluoresensi yang dimediasi probe (*probe-mediated fluorescence emission*), yang dihasilkan oleh setiap sel dalam populasi sel yang besar menghasilkan histogram multidimensi yang dapat dianalisis dengan metode statistik kuantitatif <sup>(170)</sup>. Metoda ini telah digunakan untuk mengevaluasi efek fisiologis antimikroba pada sel bakteri karena efeknya pada berbagai parameter seperti potensial membran, ukuran sel, dan bentuk sel <sup>(171)</sup>. Oleh karena itu, sejumlah peneliti telah menyelidiki *flow cytometry* sebagai metode yang potensial untuk pengujian cepat kepekaan antimikroba (88,38). Satu keuntungan dari *flow cytometry* adalah bahwa efek bakteriostatik dan bakterisidal dapat ditentukan. Efek bakteriostatik dapat dideteksi dalam 30 menit, sedangkan efek bakterisidal dapat terdeteksi dalam 3 jam. Keuntungan lain dari *flow cytometry* adalah

populasi sel yang besar dapat dinilai, yang memungkinkan visualisasi dari heterogenitas respons sel dengan mendeteksi subpopulasi yang kurang peka terhadap antimikroba.

Beberapa perusahaan telah dan mengembangkan kit dari metoda *flow cytometry* untuk AST. Salah satu produknya adalah kit FASTinov<sup>®</sup>, telah dievaluasi dalam aplikasi klinis (38). FASTinov<sup>®</sup> kit berisi agen antimikroba *lyophilized, fluorochrome* tertentu, dan perangkat lunak khusus yang memungkinkan pemilihan berdasarkan aturan klasifikasi EUCAST dan CLSI. Penggunaan kit FASTinov<sup>®</sup> ini memberikan hasil AST dalam 2 jam, yaitu 24-48 jam lebih cepat dari hasil metode Vitek 2 AST dan tingkat jumlah kesalahan (*error*) yang rendah (38).

### 8. Pengukuran *Dielectric Impedance*

Prinsip pengukuran impedansi dielektrik mikroorganisme pertama kali perkenalkan pada pergantian abad kesembilan belas, dimana penggunaan pertama metoda ini untuk pengujian kepekaan dimulai pada tahun 1977 <sup>(36)</sup>. Pengukuran impedansi dielektrik untuk AST adalah berdasarkan fenomena bahwa listrik berubah (yaitu impedansi, konduktansi, atau kapasitansi) akan terjadi di media *broth* kultur



Gambar 12 Elemen utama dari alat *flow cytometer* <sup>(2)</sup>

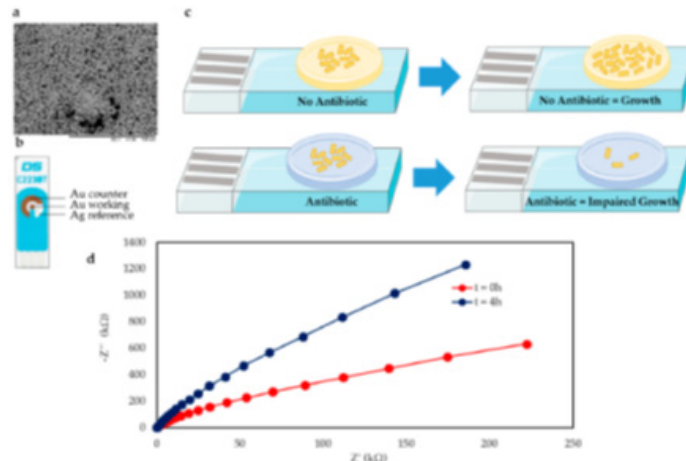


bakteri yang memungkinkan mikroorganisme dapat tumbuh hingga populasi sekitar  $10^6$  hingga  $10^7$  CFU/mL. Dalam studi impedansi dielektrik awal, dua probe listrik digunakan dengan, yang diletakkan di antara probe ini untuk menghasilkan sirkuit listrik. Ketika arus listrik diaplikasikan pada frekuensi tunggal ke rangkaian listrik ini, arus awalnya tidak dapat melewati *broth* kultur bakteri karena resistansi. Seiring pertumbuhan bakteri di dalam *broth* kultur bakteri, arus secara bertahap akan dapat melewati kultur dengan sedikit resistansi.

*Dielectric Permittivity* didefinisikan sebagai ukuran polarisasi keseluruhan dari molekul anorganik dan organik di dalam suspensi sel bakteri. Impedansi dielektrik didefinisikan sebagai total oposisi yang dihadapi oleh arus listrik saat mencoba melewati sirkuit *broth* kultur bakteri ini. Pengukuran dielektrik awalnya dilakukan dengan menggunakan frekuensi tunggal dan mampu memprediksi biomassa paling akurat selama fase pertumbuhan kultur. Selama stasioner dan fase penurunan kultur bakteri, pengukuran dielektrik ini menurun dalam akurasi. Jika antimikroba ditambahkan ke *broth* kultur bakteri, *Dielectric Permittivity* akan segera menurun jika bakteri tersebut peka terhadap antimikroba. Perubahan tersebut akan proporsional dengan konsentrasi agen antimikroba yang digunakan. Jika bakteri resistan terhadap antimikroba agen yang digunakan, permitivitas dielektrik akan terus meningkat seiring pertumbuhan bakteri. Metode impedansi dielektrik awal dijelaskan sebagai pengukuran impedansi frekuensi tunggal karena hanya frekuensi tunggal yang digunakan. Pengukuran impedansi dielektrik frekuensi tunggal telah aplikasikan pada metoda *broth dilution* AST<sup>(36)</sup> serta metode AST langsung untuk kultur darah positif (*positive blood cultures*)<sup>(202, 87)</sup>. Impedansi dielektrik dapat mengukur baik efek bakteristatik maupun bakterisidal, juga dapat mengukur stres

mikroba, yang muncul lebih cepat daripada efek bakteristatik atau bakterisidal<sup>(156, 205)</sup>.

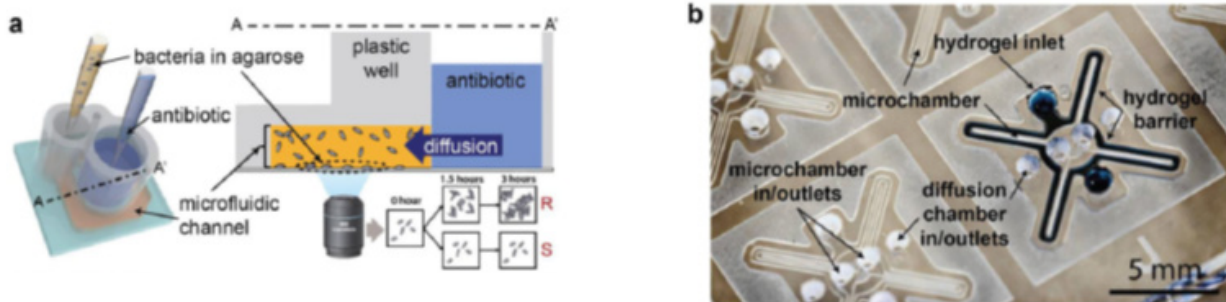
Ada beberapa kemajuan besar dalam teknik impedansi dielektrik dalam beberapa dekade terakhir yaitu membuat metodologi AST ini lebih mudah beradaptasi untuk digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis. Kemajuan pertama dari metoda ini adalah pengembangan *electrochemical screen-printed biosensor arrays*, yang merupakan langkah pertama penting untuk miniaturisasi teknologi impedansi dielektrik. Langkah selanjutnya dari miniaturisasi ini adalah pengembangan sebuah teknik pengukuran *microscale multi-frequency reactance* yang memungkinkan deteksi pertumbuhan bakteri pada konsentrasi bio-partikel yang rendah<sup>(164)</sup>. Prinsip teknologi impedansi dielektrik bergantung pada metabolisme bakteri untuk menghasilkan perubahan listrik yang dapat diukur konduktivitas<sup>(180, 36)</sup>. “Bulk” bakteri menjadi penting saat mengukur perubahan impedansi dielektrik dari waktu ke waktu, dimana pengukuran umumnya dilakukan dengan menerapkan arus frekuensi tunggal melalui sirkuit kultur *broth* bakteri. Namun, penggunaan teknik pengukuran arus multi frekuensi memungkinkan terjadinya penggunaan frekuensi yang lebih rendah dari 1 MHz untuk mengukur impedansi dielektrik pertumbuhan bakteri pada konsentrasi bio-partikel rendah (*low bulk*) dan dalam waktu yang lebih singkat (menit versus jam)<sup>(164)</sup>. Ketika *electrochemical screen-printed biosensor arrays* (seperti *printed electrodes*)<sup>(47)</sup> dikombinasikan dengan teknik pengukuran *microscale multi-frequency reactance*<sup>(164)</sup> bersama dengan metode mikrofluida<sup>(11)</sup>, hasilnya adalah metode rapid real-time AST pada *plastic microchips* dengan cetakan elektroda (*printed electrodes*)<sup>(160)</sup>. Evolusi dari teknologi impedansi dielektrik ini memiliki potensi untuk menyediakan teknologi *point-of-care platform* dengan panduan *rapid real time* untuk pemilihan terapi antimikroba.



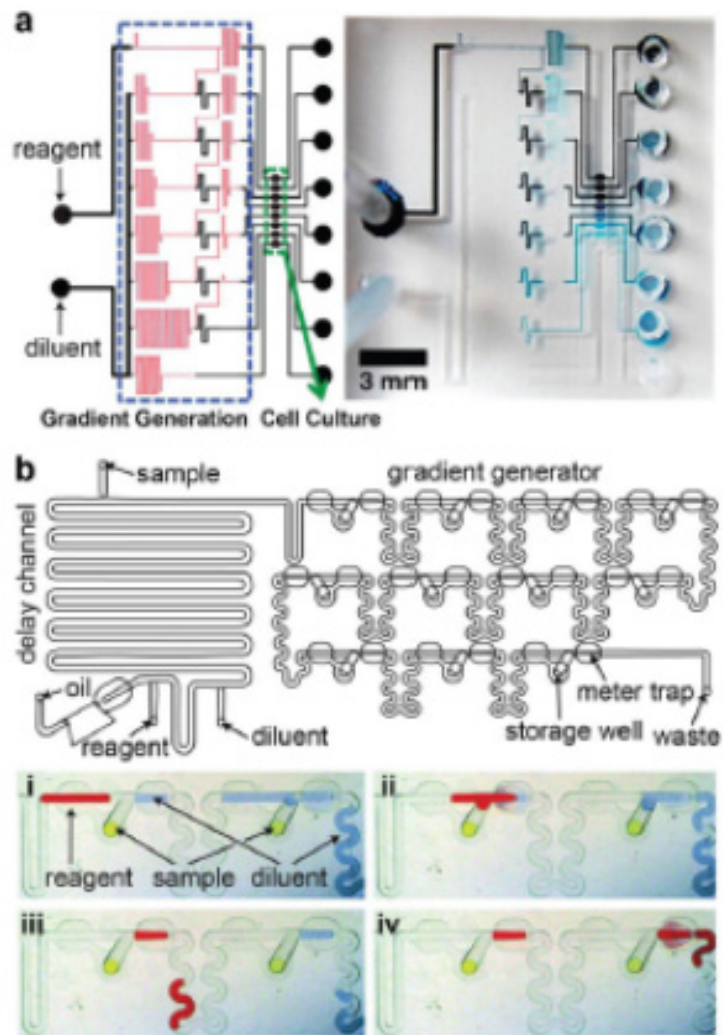
Gambar 13. (a) gambar SEM dari *gold working electrode*. (b) Skema dari *Gold DropSens SPE* menampilkan *gold counter*, *gold working*, and *silver reference*. (c) Gambaran dari teknologi sensor menunjukkan efek dari *E. coli* pada sebuah *gel-modified SPE* berisi bukan antibiotik (atas) and antibiotik (bawah). (d) *Electrochemical Impedance Spectroscopy* (EIS) melacak perbandingan skenario waktu  $t = 0$  jam (kondisi awal) dengan  $t = 4$  jam (setelah 4 jam pertumbuhan bakteri pada gel yang tidak mengandung antibiotik) <sup>(69)</sup>

9. *Microfluidics* dengan deteksi pertumbuhan  
 Uji mikrofluida memisahkan mikroorganism tunggal menggunakan *stochastic confinement* ke dalam lubang droplet bervolume nanoliter dimana pertumbuhan bakteri dapat diukur <sup>(11)</sup>. Metode ini meniadakan langkah preinkubasi sekaligus memungkinkan deteksi pertumbuhan dalam waktu yang lebih singkat (yaitu 2 jam). Bakteri dapat dideteksi pada konsentrasi 1 CFU/ $\mu$ L; Profil KHM telah terbukti sebanding dengan yang diperoleh pada metode berbasis kultur konvensional <sup>(11, 25,175)</sup>. Saluran agarosa mikrofluida berbasis *plug* (*plug-based microfluidic agarose channels*) dapat melacak pertumbuhan sel tunggal dengan keberadaan agen antimikroba dengan mengukur reduksi elektrokimia dari molekul aktif redoks seperti

resazurin <sup>(11, 25, 175)</sup> serta dengan menggunakan mikroskop <sup>(23, 22, 140)</sup>, teknologi hamburan cahaya laser maju <sup>(73)</sup>, digital mikroskop *time-lapse* <sup>(57, 56)</sup> atau penginderaan pH <sup>(177)</sup>. Dengan mengurung bakteri tunggal pada *plug* nanoliter, waktu yang dibutuhkan untuk mendeteksi pertumbuhan dikurangi menjadi beberapa jam. Selain itu, penggunaan gradien antimikroba dalam sistem berbasis mikrofluida memungkinkan investigasi kuantitatif dari efek antimikroba. Hasil dari pendekatan ini mirip dengan yang dihasilkan oleh metode pengujian kepekaan berbasis kultur konvensional. Secara khusus, uji mikrofluida sangat berguna bila dikombinasikan dengan deteksi pertumbuhan bakteri sel tunggal menggunakan teknologi pencitraan canggih (*advanced imaging technologies*).



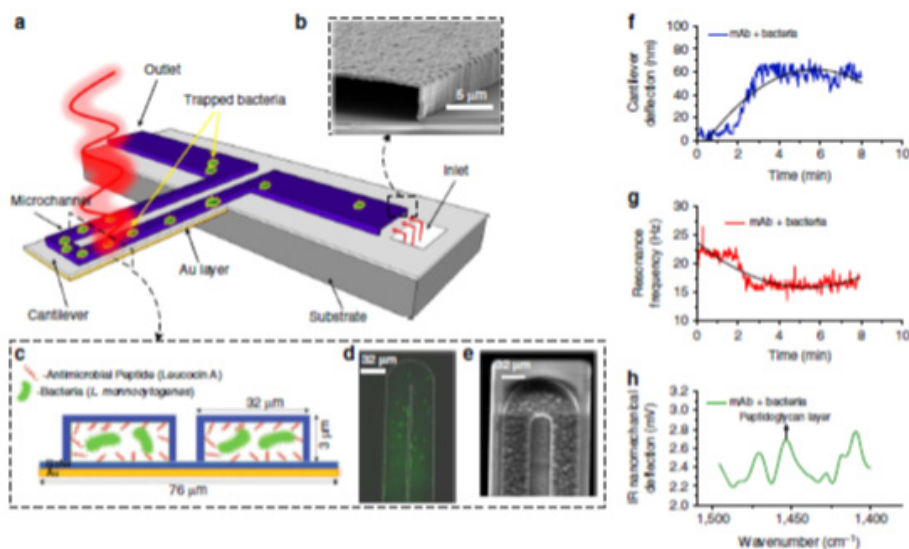
Gambar 14. Ilustrasi dari penggunaan *hydrogels* dalam *microfluidic* baik sebagai strategi immobilisasi (a) dan barrier *difusi/diffusive barrier* (b) <sup>(16)</sup>



Gambar 15. Contoh dari alat AST *gradient-generating microfluidic*: (a) menggunakan panjang kanal untuk menghasilkan konsentrasi *gradient on-chip*, bakteri ditambahkan ke dalam reagent dan diluent; (b) menggunakan *metering traps* untuk mengantarkan sampel bakteri berukuran nanoliter ke *storage well*, diikuti dengan reagen yang diencerkan. Penggabungan secara berurutan dari diluen dan reagent dalam *metering traps* membentuk sebuah *reagent plug* dengan konsentrasi kira-kira setengah dari sebelumnya<sup>(16)</sup>

10. *Microbial cell mass* dan pengukuran *density Cantilever* dengan kanal kecil memungkinkan bagian mikroba dapat digetarkan secara terus menerus<sup>(61)</sup>. Saat bakteri lewat melalui kanal-kanal ini, bobotnya akan menghasilkan perubahan frekuensi dari gerakan *cantilever*<sup>(113,62)</sup>. Sel bakteri yang kurang padat akan menghasilkan suatu perubahan yang berbeda dari sel bakteri yang lebih padat. Sel bakteri diberi agen antimikroba akan memiliki suatu perubahan dalam kepadatan massa apung (*buoyant mass density*) yang dapat diukur dengan sebuah *vibrating cantilever*. *Cantilever* dapat

dimultipleks menggunakan nanoteknologi mikrofluida untuk menghasilkan saluran nano tertanam (*embedded nanochannels*) yang dapat digetarkan menggunakan daya sentrifugal. Dengan cara ini, beberapa agen antimikroba dalam berbagai konsentrasi dapat dibuat diuji secara bersamaan untuk suatu kultur pertumbuhan tunggal<sup>(48)</sup>. Bakteri biasanya membutuhkan langkah pengayaan awal kultur serta langkah-langkah pengolahan sampel untuk menghasilkan sel tunggal yang dapat digunakan dalam pengukuran massa dan kepadatan sel<sup>(115, 113, 62)</sup>.



Gambar 16. Skema dari *bacteria microchannel* (BMC) dan operasi multi-mode nya. (a) BMC diisi dengan bakteri di atas sebuah substrat silikon. Di bagian bawah, BMC dilapisi sebuah lapisan emas dengan ketebalan 300nm berperan sebagai elemen kedua. BMC dilapisi dengan reseptor bakteri target dan diradiasi dengan panjang gelombang tertentu dari sinar inframerah. (b) Pencitraan *scanning electron microscopy* (SEM) dari persilangan *inlet*, terletak di bagian bawah *chip*. Larutan bakteri dimasukkan dari inlet. (c) Persilangan dari *microchannel* dengan lebar 32 um dari cantilever. Permukaan dalam dari *microchannel cantilever* difungsikan baik dengan mAb atau AMP (Leucocin A) dari kelas bacteriocins, yang bertindak secara khusus terhadap *L. monocytogenes*. (d) Pencitraan fluoresen dari bagian atas dari BMC, diisi dengan bakteri. (e) Pencitraan SEM dari ujung BMC. *Microchannel* bulat membantu bebas sumbatan. (f) Ketika bakteri di dalam BMC menyerap sinar inframerah, panas lokal menyebabkan defleksi/pembelokan dari BMC. (g) Frekuensi resonansi sensitif meningkatkan massa yang disebabkan oleh penyerapan dari bakteri di dalam BMC. (h) Ketika BMC diterangi dengan sinar inframerah pada kisaran tertentu, plot dari defleksi *nanomechanical* menunjukkan panjang gelombang dimana bakteri menyerap sinar inframerah. Ini dapat memberikan selektifitas yang sangat baik dalam suatu campuran kompleks.

### 11. Isothermal microcalorimetry

*Isothermal microcalorimetry* mengukur produksi panas, baik sebagai laju aliran atau akumulasi total dari waktu ke waktu; *stem* produksi panas dari metabolisme sel yang tumbuh secara aktif, dengan produksi panas kumulatif biasanya paralel dengan kurva pertumbuhan konvensional dengan kemiringan dan bentuk yang sesuai dengan lag klasik, log, dan fase diam<sup>(188)</sup>. Nilai panas maksimum sesuai dengan jumlah sel yang tumbuh dari waktu ke waktu.

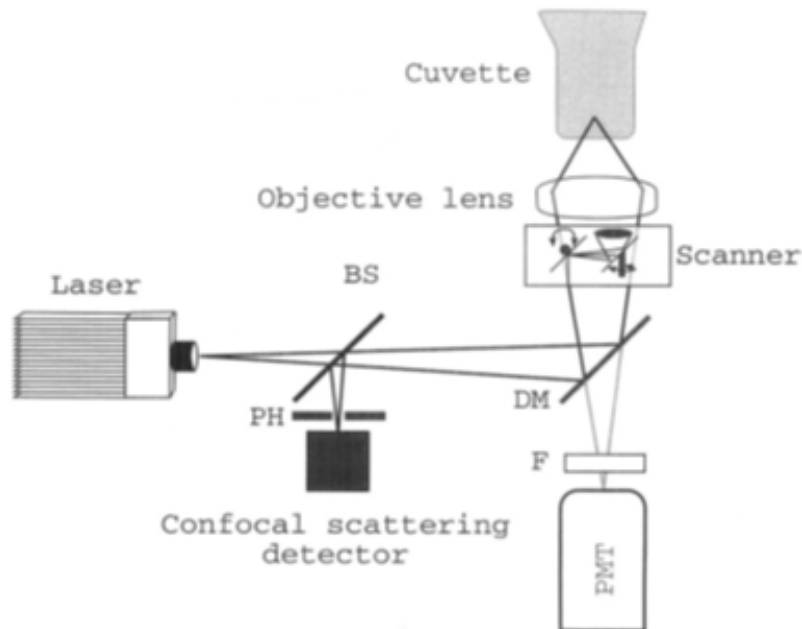
### 12. Pengujian *two-photon excitation fluorescence*

Merupakan teknik mikroskop fluoresensi yang memungkinkan pencitraan fluoresensi sel hidup<sup>(168, 70)</sup>. Uji fluoresensi eksitasi dua foton

telah digunakan untuk skrining MRSA; progresi yang berbeda dari sinyal fluoresensi terlihat untuk MRSA versus MSSA ketika pertumbuhan *S. aureus* diamati dengan adanya cefoxitin<sup>(109)</sup>. Pemantauan fluoresensi dari sampel broth dilakukan dengan mikropartikel polistiren dengan antibodi penangkap dan *tracer* yang diberi label fluoresen. Molekul pelacak (*tracer*) terikat ke mikropartikel polistiren hanya melalui antigen *S. aureus*; jumlah molekul pelacak fluoresen yang terikat ke mikropartikel meningkat dengan cepat seiring waktu hanya jika sel MRSA yang layak ada di dalam broth sampel<sup>(109)</sup>. Peningkatan cepat dalam sinyal fluoresensi dari waktu ke waktu menandakan adanya isolat MRSA.



Gambar 17. Alat Isothermal microcalorimetry<sup>(84)</sup>



Gambar 18. Skema Instrumen two-photon excitation fluorescence<sup>(168)</sup>

### 13. Uji kepekaan langsung (*Direct Susceptibility Testing/DST*)

Identifikasi cepat dan langsung dari mikroba patogen sekaligus dengan AST langsung telah lama menjadi dambaan bagi ahli mikrobiologi klinis. Uji ini mengarahkan pada inokulasi spesimen klinis ke dalam sebuah instrumen baik untuk identifikasi dan penentuan AST, dengan pengujian kepekaan langsung (DST) yang dianggap lebih relevan secara klinis terkait pemilihan/ modifikasi terapi antimikroba<sup>(87)</sup>. Spesimen urin menjadi contoh

yang tepat untuk memulai aplikasi metodaini karena infeksi saluran kemih sering memiliki mikroorganisme tunggal (misalnya, *E. coli*) pada inokulum yang sesuai (yaitu,  $10^5$  CFU / mL) <sup>(13, 136)</sup>. Studi awal ini menentukan bahwa pengujian kepekaan langsung pada urin dapat diandalkan untuk infeksi saluran kemih Gram-negatif monobakteri. Baru-baru ini, pengujian kepekaan langsung telah digunakan pada sampel klinis lain seperti spesimen saluran pernapasan, spesimen cairan empedu, dan spesimen abses abdomen <sup>(37)</sup>. Banyak dari

spesimen klinis ini diharapkan mengandung lebih banyak mikroorganisme dan akan memiliki inokulum yang kurang terdefinisi dengan baik. Namun, Hasil dalam penelitian ini <sup>(37)</sup> untuk hasil AST dan DST sebanding untuk bakteri Gram-negatif dengan 93,4% *total agreement* dan 1,6% ketidaksesuaian minor, 4,6% ketidaksesuaian mayor, dan 0,4% ketidaksesuaian sangat mayor.

Aplikasi klinis lain dari DST cepat yang diinginkan adalah pasien dengan sepsis dan spesimen darah <sup>(140)</sup>. Metode ini terus dioptimalisasi menggunakan spesimen darah untuk mengidentifikasi mikroorganisme penyebab sepsis; karenanya, sejumlah peneliti mempelajari uji kepekaan antimikroba langsung dari spesimen darah untuk mengurangi waktu hasil <sup>(127)</sup>. Pendekatan yang lebih cepat menggunakan darah untuk inokulum. Pendekatan ini sedang dievaluasi untuk metode molekuler dan untuk satu deteksi bebas kultur (*one culture-free detection*), identifikasi, dan Metode AST fenotipik cepat <sup>(165)</sup>. Dengan metoda ini, identifikasi bakteri dari sampel darah dapat dicapai secara langsung dalam 84 menit, dan AST fenotipik cepat dalam 204 menit <sup>(165)</sup>. Metode ini menggunakan *platform immunoassay* <sup>(120)</sup> untuk deteksi langsung mikroorganisme dalam darah tanpa perlu pengayaan kultur, dimana deteksinya berdasarkan teknologi deteksi enzimatik efek medan (*Field-Effect Enzymatic Enrichment/ FEED*) <sup>(24)</sup> di mana targetnya diimobilisasi pada elektroda pendeteksi dan sinyal deteksi diperoleh dengan mengukur arus puncak reduksi dari suatu enzim yang digunakan untuk memberi suatu antibodi.

Metode ini membutuhkan suatu antibodi terhadap suatu patogen potensial, namun, spesifisitas antibodi terhadap mikroba patogen berkurang karena kemungkinan tercampur mikroorganisme dalam sampel klinis. Pengujian AST dilakukan dengan mengukur perubahan

konsentrasi bakteri (CFU/mL) setelah terpajan antimikroba yang menggunakan FEED. Reaksi kekebalan antara mikroorganisme dan antibodinya sangat spesifik dan oleh karena itu memberikan pemilihan dari suatu mikroorganisme spesifik dalam suatu populasi mikroorganisme campuran<sup>(190)</sup>.

#### 14. Pendekatan biologi sintetis (*synthetic biology approaches*)

Pendekatan biologi sintetis berbasis bakteriofag atau menggunakan sirkuit gen rekayasa (*engineered gene circuits*) merupakan uji AST cepat dan inovatif yang sedang dikembangkan <sup>(167, 121, 193, 12)</sup>. Salah satunya adalah Tes kultur darah *MicroPhage KeyPath MRSA/ MSSA* yang mengidentifikasi *Staphylococcus aureus* dan dapat membedakan antara MSSA dan MRSA menggunakan sampel yang diambil langsung dari kultur darah <sup>(6)</sup>. Diferensiasi dilakukan dengan menambahkan cefoxitin ke dalam pengujian sehingga MRSA dapat berkembang, tetapi tidak untuk MSSA, pertumbuhan MRSA dengan demikian memperkuat fag dan menghasilkan pembacaan yang positif <sup>(6)</sup>.

Bakteriofag juga dapat dikombinasikan dengan gen *firefly luciferase* untuk membuat sebuah "*reporter luciferase phage*" <sup>(138)</sup>. Cara ini telah dilakukan dengan menggunakan *reporter luciferase mycobacteriophages* <sup>(43)</sup> untuk melakukan pengujian kepekaan antimikroba pada strain *Mycobacterium tuberculosis* <sup>(43, 5)</sup>. Produksi cahaya oleh gen luciferase membutuhkan *M. tuberculosis* aktif secara metabolik dimana fag reporter bereplikasi memungkinkan gen luciferase untuk diekspresikan. Ketika suatu obat yang peka terhadap strain *M. tuberculosis* diinkubasikan dengan obat antituberkulosis yang efektif, strain ini tidak dapat menghasilkan cahaya karena tidak aktif secara metabolik. Sebaliknya, strain yang resistan terhadap obat dapat berkembang biak dengan adanya obat antituberkulosis dan

menghasilkan cahaya pada tingkat yang sama dengan kontrol yang tidak diobati. Teknologi Luciferase reporter phage telah diadaptasi oleh GeneWEAVE ("Smarticles") dan akan diadaptasi lebih lanjut oleh Roche.

Aplikasi lain dari pendekatan biologi sintetik untuk deteksi cepat RNA atau DNA dengan keberadaan antimikroba spesifik adalah *Toehold switches* untuk merespon RNA endogen<sup>(64)</sup>, sedangkan *padlock probe* dengan amplifikasi untuk deteksi DNA<sup>(135)</sup>. Sebagai contoh, *padlock probe* digunakan untuk mutasi yang paling umum terkait resisten rifampisin pada *M. tuberculosis* yang dikombinasi dengan sebuah *probe* untuk identifikasi kompleks *M. tuberculosis* dan digunakan untuk menentukan *strain* resisten rifampisin<sup>(46)</sup>. Studi lain menggunakan suatu langkah inkubasi singkat dengan adanya dan tidak adanya agen antimikroba yang berbeda digabungkandengan *padlock probe* spesifik spesies untuk mendeteksi DNA target bakteritelah terbukti mampu menentukan profil kepekaan antimikroba *E. coli* dengan akurasi 100% dalam 3,5 jam<sup>(129)</sup>.

#### 15. Fluorescence proteins and dyes

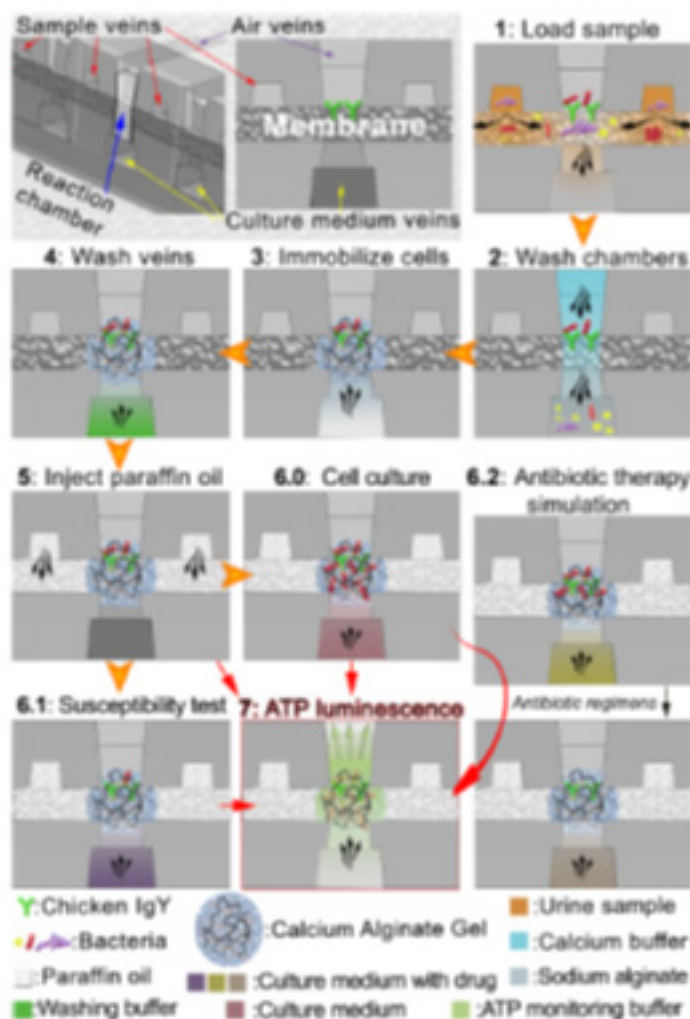
Metoda ini biasanya digunakan untuk menandai biomarker resisten. Protein/pewarna (*dyes*) ini dapat berasal dari bahan biologik atau kimia. Salah satu protein pionir yang digunakan untuk pencitraan adalah green fluorescent protein (GFP). GFP, diperoleh dari ubur-ubur *Aequoria victoria*, sangat penting untuk pemantauan *real-time* noninvasif dari kepekaan antimikroba<sup>(191)</sup>. Selain itu, protein ini juga mampu mengevaluasi beberapa sensitivitas antibiotik secara *real-time* dalam kultur bakteri strain polimikroba (yaitu, *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *K. pneumoniae*) secara bersamaan. Fluorescen protein tagging hijau dan merah digunakan untuk kuantifikasi pertumbuhan *real-time* dengan adanya beberapa antibiotik pada platform mikrofluida multipleks<sup>(131)</sup>. Metode ini sensitif dan dapat diandalkan,

tetapi menciptakan bakteri rekombinan ini membutuhkan penanganan molekuler, yang merupakan suatu tantangan untuk pengamatan klinis rutin.

Pewarna fluoresen adalah cara lain untuk penandaan fluoresensi optik. Bahan kimia ini, dengan semua manfaat protein fluoresensi, dapat menghindari rintangan stearat karena ukurannya yang kecil, dan meniadakan kloning atau transformasi. SYTOX hijau dan resazurin (*AlamarBlue*; prekursor resazurin yang tidak aktif) adalah dua pewarna indikator fluoresensi yang umum digunakan untuk pengujian viabilitas dalam AST<sup>(103, 45)</sup>. Selain itu, resazurin dapat digunakan dalam deteksi kolorimetri. Ketika media kultur ditambah antibiotik dan resazurin, warna biru pekat yang seragam diperoleh. Adanya resistensi, resazurin direduksi menjadi resafurin, dan warna biru pekat berubah menjadi merah muda dan *leuco*; ketiadaan resistensi pada bakteri menyebabkan warna biru bertahan. Metode ini juga ditranslasikan ke dalam chip mikrofluida untuk estimasi KH Mempat antibiotik yang berbeda terhadap 20 klinis *strain Escherichia* dan *Shigella* untuk estimasi KHM untuk empat antibiotik berbeda<sup>(45)</sup>.

#### 16. Bioluminescence / ATP Bioluminescence Assay (ATP-BLA)

*Bioluminescence / ATP Bioluminescence Assay* adalah pendekatan berbasis enzim dimediasi oleh enzim luciferase yang mengubah substrat luciferin menjadi oxyluciferin dengan adanya ATP, menyebabkan emisi cahaya<sup>(122)</sup>. Dengan menggunakan fenomena ini, kepekaan 13 berbeda jenis strain klinis yang ada pada infeksi saluran kemih (*urinary tract infection/ UTI*) dievaluasi terhadap delapan antibiotik pada piring mikrofluida. Ketika bakteri tumbuh dalam keberadaan antibiotik, bakteri resisten dihasilkan di dalam bioluminescence, sedangkan bakteri yang peka tetap netral. Baik uji identifikasi dan kepekaan diperoleh dalam waktu 3-6 jam<sup>(41, 96)</sup>.



Gambar 19. Protokol umum dari uji IATP-BLA (*ImmunosorbentATP Bioluminescence Assay*) di dalam simulator microfluida. Uji IATP-BLA diproses di dalam unit chamber reaksi vertikal. Antibodi IgY spesifik diimmobilisasi di membran *fiberglass* selama fabrikasi. Prosedur standar dijelaskan sebagai berikut: (1) sampel urin dimasukkan ke dalam sampel *veins*, dan mikroba spesifik ditangkap oleh antibodi IgY; (2) mikroba yang tidak terikat dibuang; (3) sel-sel yang ditangkap dibungkus secara in situ dengan gel kalsium alginat; (4) larutan natrium alginat dicuci; dan (5) minyak paraffin disuntikkan ke dalam isolat tiap *chamber* reaksi. Setelah itu, opsi berbeda akan dipilih untuk *channel* berbeda. (6.0) mikroba tertangkap dapat direproduksi sebelum ATP-BLA; (6.2) mikroba tertangkap dapat dihambat dengan serangkaian regimen antibiotik sebelum ATP-BLA; atau (6.1) mikroba tertangkap dapat dihambat dengan suatu antibiotik dalam AST; (7) terakhir sel-sel akan dihitung dengan ATP-BLA dalam sebuah *microplate reader* <sup>(41)</sup>

#### 17. Metoda elektrokimia (*electrochemical*)

Beberapa perangkat elektrokimia telah dikembangkan untuk AST, salah satunya adalah *AC electrokinetic fluid motion* dan *Joule heating-induced temperature elevation*, yang digunakan untuk penginderaan elektrokimia dari 16S rRNA bakteri <sup>(86)</sup>. Deteksi cepat dan *real-time* dimungkinkan, karena 16s rRNA

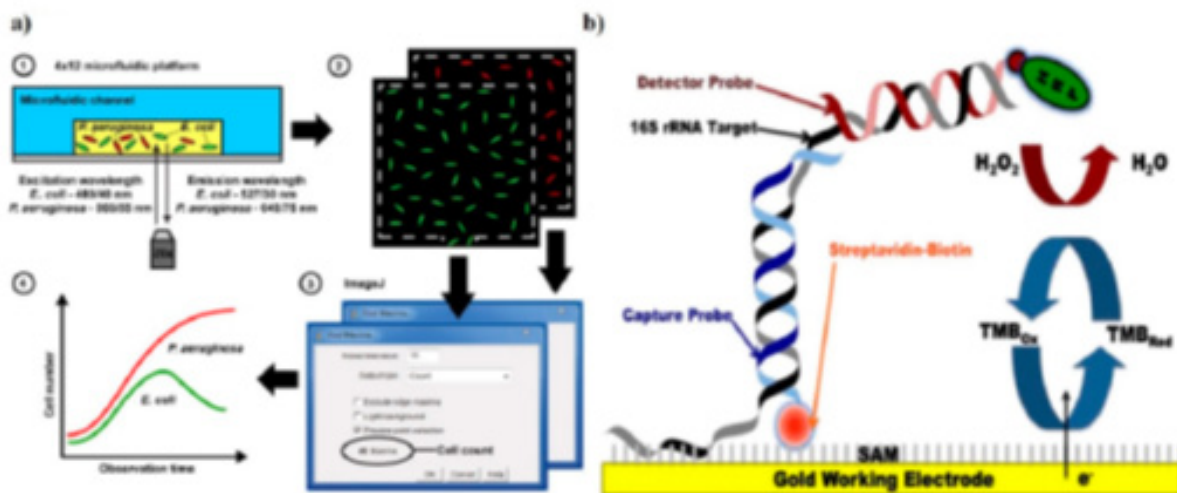
sangat spesifik untuk bakteri patogen dalam kultur darah dan tidak memerlukan pemurnian awal. Meskipun 16S rRNA memberikan hasil analisis yang sensitif, kompleksitas genetik lintas *kingdoms* membuatnya tidak sesuai untuk pengujian kepekaan yang dapat direproduksi (*reproducible*), relevan secara klinis, atau pengujian kepekaan *point-of-care* (*point-of-*



care susceptibility testing). Penggunaan bahan kimia elektroaktif (reagen redoks) sebagai molekul probe dapat menjadi pendekatan yang menarik dalam menjelaskan kepekaan bakteri. Pada 2015, *pyocyanin*, penanda potensial viabilitas dan virulensi sel, telah dipelajari untuk pemantauan elektrokimia dari kepekaan biofilm *P. aeruginosa* pada sebuah perangkat *microfluidic*<sup>(192)</sup>. Korelasi yang baik antara penurunan sinyal listrik dan viabilitas sel *P. aeruginosa* terhadap adanya antibiotik berhasil dibuktikan. Biosensor elektrokimia terbaru bisa melakukan AST dalam waktu 90 menit bersamaan dengan isolasi bebas label (*label-free*) bakteri dari sampel darah lengkap<sup>(160)</sup>. *Microchip* berbahan dasar plastik dengan elektroda tercetak menangkap bakteri target dengan bantuan antibodi spesifik. Respon elektrokimia terhadap bakteri yang ditangkap dipantau baik dengan adanya maupun tidak adanya antibiotik.

### 18. Simplified Blood Culture System (SBCS)

Sistem kultur darah yang disederhanakan (SBCS) adalah suatu alat yang digunakan untuk pengujian pasien dan alat pengawasan untuk infeksi aliran darah<sup>(39)</sup>. SBCS menggunakan sampel yang belum diproses, dengan demikian tidak membutuhkan waktu persiapan sampel. Selanjutnya, SBCS menggabungkan deteksi, status Gram, dan identifikasi dalam instrumen kultur darah, sehingga memastikan evaluasi kepekaan dalam 8-12 jam, sedangkan sistem kultur darah konvensional membutuhkan waktu hingga 48 jam karena inkubasi untuk pembentukan koloni dan pengujian kepekaan. Apalagi karena sifatnya yang sederhana dan efisiensi waktu, SBCS dapat digunakan di lingkungan dengan sumber daya terbatas, yang tidak mungkin dilakukan untuk metode kultur darah konvensional karena keterbatasan listrik, botol kultur, debu yang banyak, kontrol suhu lingkungan yang tidak tepat, dan kurangnya personel yang terampil<sup>(92)</sup>.



Gambar 20. Tampilan sensor untuk uji AST meliputi (a) sebuah biosensor mikrofluida optik, menunjukkan deteksi optik dari kultur mikroba, and (b) sebuah biosensor elektrokimia, pendeteksian berdasarkan hibridisasi dari 16SrRNA bakteri target dengan sebuah probe detektor<sup>(107)</sup>

#### 19. Sistem Instrumen semi otomatis/otomatis

Metoda AST fenotipik tradisional/konvensional seperti difusi cakram, mikro dilusi broth biasanya melibatkan paparan kontinu dari isolat bakteri ke agen antimikroba diikuti oleh penentuan visual pertumbuhan setelah 18-24 jam inkubasi<sup>(195, 99,173)</sup>. Percepatan metoda AST tradisional tersebut umumnya berfokus pada peningkatan sensitivitas deteksi pertumbuhan<sup>(124, 115, 174, 66)</sup>. Metoda ini sering kali melibatkan instrumen semi-otomatis/otomatis yang menggunakan sistem optik untuk deteksi pertumbuhan. Beberapa dari instrumen semi-otomatis ini melakukan "pengujian *breakpoint*," dimana ada dua konsentrasi yang diuji sebagai lawan serial pengenceran yang melibatkan delapan sampai sepuluh konsentrasi yang diuji. Instrumen semi-otomatis seperti *Thermo Fisher Sensitre System*, *Beckman Coulter MicroScan*, *Biomérieux Vitek*, dan *BD Phoenix* menggunakan sistem optik untuk mengukur perubahan halus dalam pertumbuhan bakteri untuk menghasilkan kepekaan hasil tes dalam 6-12 jam daripada 18-24 jam<sup>(172, 116, 117, 75)</sup>. Dasar dari instrumen semi otomatis ini adalah metoda *broth microdilution*<sup>(98,197, 114)</sup> yang telah menggantikan metoda dilusi agar sebagai standar referensi yang digunakan untuk membandingkan semua metoda AST saat ini termasuk dalam pengembangan, verifikasi, validasi, dan uji klinis<sup>(181)</sup>. Metoda semi instrumen otomatis ini tepat, handal, dan memberikan hasil kuantitatif, bahkan, mereka telah siap menjadi teknologi mutakhir dan merupakan metoda utama digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis saat ini<sup>(174)</sup>. Walaupun sistem ini membutuhkan bakteri terisolasi dalam kultur murni, akan tetapi dapat memberikan hasil dalam 6-12 jam.

Sejak awal teknologi otomatis diperkenalkan pada 1980-an, uji kepekaan antibiotik telah dilakukan perbaikan secara terus-menerus dan, karenanya, telah menggantikan metoda

fenotipik konvensional<sup>(153, 176)</sup>. Otomatisasi, kesederhanaan, dan kekompakan adalah alasan utama sistem otomatis ini diterima luas di bidang diagnostik<sup>(179)</sup>. Dipadukan (intergrasi) dengan komputer telah memungkinkan analisis secara *online* dan berbagi data, yang sangat membantu untuk validasi hasil, terutama di daerah terpencil<sup>(155)</sup>. Di antara sistem otomatis yang dikembangkan, *MicroScan WalkAway* (Beckman Coulter, Inc. Atlanta, Georgia, AS) (1980), *Micronaut* (Merlin, Berlin, Jerman) (1990), *the Avantage Test* (Abbott Laboratories, Irving, Texas, USA) (1980), *Vitek 2* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Prancis) (2000), *Phoenix* (BD Diagnostics, Franklin Lakes, New Jersey, USA) (2001), dan *Sensitre ARIS 2X* (Trek Diagnostic Systems, Oakwood Village, Ohio, USA) (2004) adalah salah satu sistem otomatis yang disetujui FDA untuk AST. *Vitek* dan *Phoenix* mendeteksi pertumbuhan bakteri berdasarkan kekeruhan, sedangkan sistem otomatis sebanding seperti *MicroScan WalkAway* (BeckmanCoulter, Inc. Atlanta, Georgia, AS) dan *Sensitre ARIS 2X* didasarkan pada emisi fluoresensi bakteri yang tumbuh. Resistansi pada strain bakteri Gram negatif, Gram positif, dan *Streptococcus* dapat dengan mudah diprediksi melalui *Phoenix*, dan *Vitek 2*, tetapi, *MicroScan WalkAway* dan *Sensitre ARIS 2XESBL* (Sistem Diagnostik Trek, Oakwood Village, Ohio, USA) mampu mendeteksi strain yang memproduksi ESBL dalam spesies yang disebutkan di atas<sup>(163, 176)</sup>. *Micronaut* dan *Avantage* mampu melakukan pengujian kepekaan langsung yang akurat masing-masing untuk bakteri Gram positif dan negatif<sup>(201, 194)</sup>.

Ketidacocokan deteksi untuk banyak bakteri/antibiotik menggunakan *Sensitre ARIS 2* dan *Vitek 1* telah mengarah pada pengembangan *Sensitre ARIS 2X* dan *Vitek 2* yang diperbarui, yang memiliki performa lebih baik dan dapat diaplikasikan untuk bakteri/antibiotik yang lebih luas. Saat ini, semua sistem

otomatis digabungkan dengan sistem perangkat lunak yang canggih untuk meningkatkan kinerja dan pemrosesan data *online*. Setiap sistem otomatis memiliki kapasitas panel tertentu dan waktu rata-rata untuk melakukan deteksi, yang bervariasi dari 40 hingga 100 *wells* dan dalam waktu 20, 12, dan 9 jam. Model tertentu seperti Phoenix AP, dan Vitek 2XI, didedikasikan untuk inokulasi secara otomatis, kapasitas dan kekompakan *card* yang ditingkatkan kinerjanya. Phoenix, Sensititre ARIS 2X, Vitek 1 dan 2, dan Instrumen *WalkAway* memanfaatkan sistem komputerisasi untuk menafsirkan hasil kepekaan termasuk "*expert system*" untuk menganalisis hasil tes terhadap pola atipikal dan resistansi fenotipe yang tidak biasa<sup>(16, 163)</sup>.

Berikut penjelasan singkat terkait beberapa contoh instrumen dari pengembangan sistem otomatis untuk AST, diantaranya adalah:

**MicroScan WalkAway plus System** (*Siemens Healthcare Diagnostics*) berupa perangkat pembaca (*reader*) atau alat seperti sebuah inkubator besar yang dapat menginkubasi dan menganalisis 40–96 *microdilution tray*. *WalkAway* menggunakan *microdilution tray* berukuran standar yang terhidrasi dan diinokulasi secara manual dan kemudian ditempatkan di salah satu slot inkubator di dalam instrumen. Baki (*tray*) diinkubasi selama waktu yang ditetapkan, diperiksa secara berkala baik dengan

fotometer atau fluorometer untuk menentukan perkembangan pertumbuhan bakteri. Panel uji kepekaan Gram negatif yang mengandung substrat fluorogenik dapat dibaca dalam 3,5–7 jam. Panel Gram positif dan negatif menggunakan titik akhir turbidimetrik dapat dibaca dalam 4,5–18 jam. Dipercaya sebagai sistem otomatis pertama yang menawarkan uji identifikasi dan AST untuk deteksi bakteri yang resistan *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (VRSA).

**BD Phoenix™ Automated Microbiology System** (*BD/Becton Dickinson Diagnostic*) memiliki pembaca inkubator yang besar dengan kapasitas untuk memproses 99 panel uji yang berisi 84 *wells* dikhususkan untuk penggantian pengenceran antibiotik dan diinokulasi secara manual. Alat ini memonitor tiap panel setiap 20 menit menggunakan turbidometri dan deteksi pertumbuhan kolorimetri (indikator reduksi oksidasi). Panel uji tersedia untuk Gram negatif, Gram positif, *S. pneumoniae*, kelompok *Streptococcus beta-haemolyticus* dan *Streptococcus viridans*, serta KHM dihasilkan dalam 6–16 jam. Selain itu memberikan akurasi yang tinggi dan cepat dalam mendeteksi MRSA, VRE and *extended spectrum beta-lactamase* (ESBL) yang merupakan penanda resistansi (*resistance markers*) yang paling penting terhadap infeksi terkait perawatan kesehatan (*Healthcare Associated Infections/HAIs*)<sup>(118)</sup>.



Gambar 21. *MicroScan WalkAway plus System* dari *Siemens Healthcare Diagnostics*<sup>(76)</sup>



Gambar 22. BD Phoenix™ Automated Microbiology System dari BD Diagnostic<sup>(79)</sup>

**Vitek 2 system** (bioMe´rieux), alat ID/AST yang sangat otomatis dan menggunakan reagen plastik yang sangat kompak (ukuran kartu kredit, 10x cm 6 cm x 0,5 cm) dengan berat sekitar 16 gram, mengandung antibiotik dalam jumlah mikroliter dan media uji dalam format *64-well card*. Vitek 2 menggunakan turbidimetri berulang yang memantau pertumbuhan bakteri selama masa inkubasi yang singkat. Instrumen dapat dikonfigurasi untuk mengakomodasi 30–240 tes secara bersamaan/simultan. Kartu kepekaan (*susceptibility cards*) memungkinkan pengujian umum, Gram positif yang berkembang pesat, dan bakteri Gram negatif aerob, dan *S. pneumoniae* dalam suatu periode dari 4–10 jam. Alat ini menggunakan

*Advanced Colorimetry*, sebuah teknologi yang memungkinkan identifikasi isolat klinik secara rutin dan memiliki kemampuan yang tinggi untuk membedakan antar spesies <sup>(9, 10, 141)</sup>.

**Sensititre ARIS 2X** (Thermo Scientific) sistem pembacaan dan inkubasi semalam (*overnight*) dan otomatis dengan 64-kapasitas panel. Panel uji berupa lempeng *96-well microdilution* standar yang dapat diinokulasi dengan *Sensitre Autoincubator*. Pertumbuhan ditentukan oleh pengukuran fluoresensi setelah inkubasi 18-24 jam. Panel uji tersedia untuk bakteri Gram positif dan negatif, *S. pneumoniae*, spesies *Haemophilus*, dan Gram negatif *Bacilli* nonfermentatif.



Gambar 23. Alat Vitek 2 Compact dari bioMe´rieux<sup>(80)</sup>



Gambar 24. Alat Sensititre ARIS 2X dari Thermo Scientific<sup>(86)</sup>

Sistem yang disebutkan di atas memiliki kelemahan dalam reproduksibilitas, sensitif, dan kehandalan dibandingkan dengan metoda tradisional yang ada. Selain itu, ketidakmampuan untuk menguji berbagai macam bakteri yang relevan secara klinis (misalnya, *S. pneumoniae*), agen antimikroba (misalnya, *vankomisin*), dan isolat hetero resistan, serta kapasitas panel yang terbatas dan mahalnya instrumen dan bahan habis pakai, semuanya merupakan masalah signifikan yang membatasi sistem ini dari analisis rutin <sup>(66)</sup>. Pada akhirnya, metoda yang dipilih akan disesuaikan dengan kapasitas, sumber daya, keahlian, serta biaya yang tersedia <sup>(9, 10, 169)</sup>.

#### IV. UJI AST SECARA GENOTIPE

Metode genotipe umumnya dikaitkan dengan deteksi gen resistansi yang cepat, langsung, sensitif, dan spesifik. PCR, *DNA microarrays* dan *DNA chips*, dan *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) adalah beberapa di antaranya teknik genotipe untuk mendeteksi resistansi antibiotik. Penilaian mutasional resistansi methicillin pada *Staphylococcus spp.*, resistansi vankomisin

pada *Enterococcus spp.*, dan resistansi multi-antibiotik (*isoniazid*, *rifampisin*, *streptomisin*, *pirazinamid*, dan *fluoroquinolon*) pada *Mycobacterium spp.* telah berhasil dideteksi melalui berbagai teknik genotipe.

Terlepas dari kelebihanannya, metoda genotipe juga memiliki kelemahan yang dapat mengurangi aplikasinya secara klinis. Kekurangan tersebut antara lain: (i) antimikroba tunggal yang akan diuji membutuhkan uji spesifik untuk deteksi; (ii) hanya gen resistansi potensial yang dapat dideteksi, yang seringkali tidak relevan karena mutasi kebetulan; (iii) kurangnya kepekaan terhadap pasien dengan infeksi laten, atau ketika hanya sedikit organisme yang ada dalam sampel; (iv) mekanisme/profil genetik untuk resistansi semua bakteri belum ditentukan; (v) terjadinya hasil positif palsu karena kontaminasi sampel uji mungkin terjadi; (vi) membutuhkan reagen dan alat yang mahal dengan kondisi perawatan khusus; dan yang terpenting (vii) semua alat membutuhkan prasyarat personel yang terampil <sup>(34)</sup>.

##### 1. PCR

PCR adalah teknik molekuler yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun

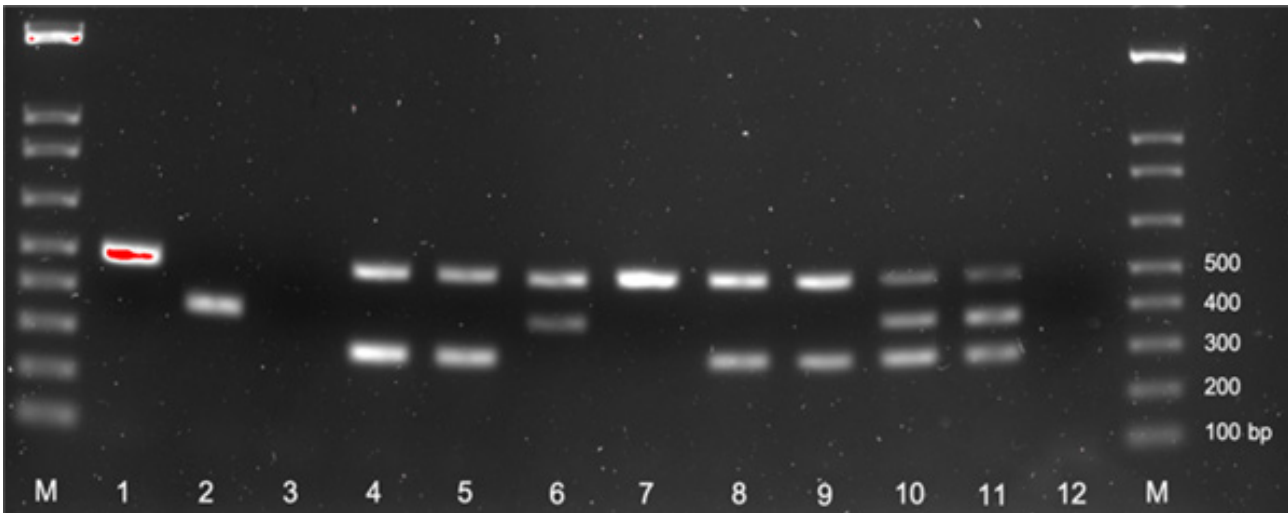
1983 yang memungkinkan replikasi DNA. Laporan penggunaan PCR untuk diagnostik pertama kali dilaporkan oleh Saiki *et al.*<sup>(54)</sup>. Dengan menggunakan PCR, salinan DNA dalam jumlah yang sangat kecil diperkuat secara eksponensial dalam serangkaian siklus perubahan suhu. Selanjutnya, dengan menggunakan urutan DNA untai tunggal kecil yang unik (*unique single stranded DNA*), yang dikenal sebagai primer, dan enzim DNA *Taq Polymerase*, dapat menargetkan dan memperkuat wilayah tertentu yang diinginkan.

Pertama, sampel DNA dipanaskan hingga sekitar 95°C untuk mendenaturasi dan memisahkan untai ganda menjadi molekul beruntai tunggal. Kedua, suhu dikurangi menjadi sekitar 50°C untuk memungkinkan primer mengikat ke wilayah yang diinginkan. Ketiga, suhu dinaikkan menjadi sekitar 68°C untuk memungkinkan enzim polimerase untuk menggabungkan nukleotida baru dan memperpanjang urutan *template*. Reaksi dilakukan dalam instrumen yang disebut *thermal cyclers*, contoh ditunjukkan pada Gambar di bawah ini.

Kita dapat menggunakan informasi dan pengetahuan yang diperoleh dari sekuensing seluruh genom organisme sebelumnya dalam merancang primer yang menargetkan gen unik untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan bakteri misalnya *Vibrio cholerae*<sup>(166)</sup> atau *Salmonella typhi*<sup>(111)</sup>, turun ke tingkat *strain*. Jika ingin mengetahui urutan gen resistansi tertentu, kita dapat merancang primer menggunakan informasi ini untuk pengujian PCR dan menentukan apakah gen tersebut ada atau tidak ada dalam sampel DNA. Misalnya, jika merancang primer yang spesifik untuk tiga gen resistansi berbeda, dapat melakukan reaksi PCR *multiplex* untuk menentukan apakah sampel yang diuji memiliki gen resistansi tertentu. Dalam PCR tradisional, hasilnya dianalisis pada akhir reaksi menggunakan teknik seperti elektroforesis gel untuk memvisualisasikan setiap amplicon target. Di bawah ini adalah gambar gel dari contoh reaksi multipleks menggunakan primer yang dirancang untuk menargetkan gen resistansi tertentu, menghasilkan amplicon dari berbagai ukuran - 488, 374 dan 283 *base pairs* (pasangan basa).



Gambar 25. Alat *The T100 Thermal Cycler* dari *Bio-Rad*<sup>(81)</sup>



Gambar 26. Gel dari percobaan PCR menggunakan tiga pasang primer yang menargetkan gen resistansi<sup>(6)</sup>

Teknik PCR lain, seperti PCR kuantitatif (*Quantitative PCR/qPCR*, juga disebut *real-time PCR/RT-PCR*) selain dapat mengidentifikasi ada atau tidak adanya gen tertentu yang diinginkan juga dapat mengkuantifikasi dan menghasilkan analisis yang lebih sensitif<sup>(198)</sup>. Dengan menggunakan teknik ini, jumlah setiap target potensial diukur pada setiap siklus reaksi secara *real time*, bukan pada akhir reaksi. PCR kuantitatif ini dapat dicapai dengan menggunakan salah satu dari dua metoda di bawah ini:

a. Metoda berbasis pewarna/*dye-based method*

Dimana pewarna *interchelating* (biasanya

*SYBR Green*) mengikat DNA untai ganda. Ketika tidak terikat penanda/*markers, fluorescent* memiliki sinyal yang sangat rendah, akan tetapi menunjukkan fluoresensi tinggi ketika diikat. Sinyal fluoresensi diukur setelah setiap siklus amplifikasi. Pewarna DNA mudah digunakan dengan primer standar tetapi tidak spesifik urutan karena mengikat pada molekul beruntai ganda. Analisis tambahan diperlukan untuk menilai panjang amplicon qPCR, baik pendekatan berbasis perangkat lunak (misal *melt-curve analysis*) atau dengan elektroforesis gel untuk memvisualisasikan panjang produk yang diampifikasi<sup>(55)</sup>.



Gambar 27. Alat QuantStudio7 Real-Time PCR system dari Applied Biosystems<sup>(85)</sup>

b. Metoda berbasis probe/probe-based method (biasanya probe TaqMan)

Metoda ini menggunakan primer dalam kombinasi dengan probe spesifik untuk mendeteksi amplifikasi target. Probe adalah sekuens pendek DNA yang memiliki pewarna reporter fluorophore yang melekat pada ujung 5', dan fluorescence quencher pada ujung 3'. Urutan probe adalah pelengkap wilayah DNA dalam produk ampikon yang diinginkan. Pewarna hanya akan memancarkan sinyal jika dimasukkan ke dalam perpanjangan wilayah yang diinginkan. Jumlah fluoresensi yang dihasilkan sebanding dengan jumlah produk qPCR yang dihasilkan. Dengan probe berbasis kimia/probe-based chemistry dapat melipatgandakan target dalam reaksi tunggal menggunakan tag fluorescent yang unik<sup>(198)</sup>.

Peralatan laboratorium yang besar dan mahal yang telah membatasi aplikasinya dalam melaksanakan percobaan/eksperimen di lapangan, berkat perkembangan teknologi terkini, dimungkinkan untuk melakukan eksperimen PCR dan qPCR di lapangan menggunakan peralatan portabel yang ditunjukkan seperti gambar di bawah ini, sebagai contoh portable, battery powered thermal cycler dari mini PCR. Alat ini berguna untuk mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk

mendapatkan hasil yang dapat memiliki dampak besar jika ada terjadi wabah/outbreak<sup>(151)</sup>.

2. DNA microarrays dan DNA chips

Merupakan teknologi menjanjikan lainnya yang digunakan untuk skrining kepekaan<sup>(59)</sup>. Susunan DNA menggunakan probe fragmen cDNA pada membran nilon, dimana masing-masing chip DNA memiliki sebuah platform kaca atau silikon untuk pengikatan probe. Hibridisasi spesifik dari label probe dengan target dan pengenalannya membantu untuk menentukan resistansi. Penentuan Resistansi isoniazid pada *M. tuberculosis* telah berhasil dilakukan DNA microarrays dan chips Alat menggunakan deteksi kolorimetri dan multiplexing yang merupakan fitur menarik dari teknik ini<sup>(67, 89)</sup>.

3. Teknologi Sekuensing

Sejak selesainya proyek genom manusia pada tahun 2003, kemajuan luar biasa telah dicapai dengan menggunakan teknologi sekuensing genom, yang menyebabkan penurunan biaya per megabase dan peningkatan jumlah dan keragaman genom yang disekuensing. Terlebih, kompleksitas dari arsitektur genom juga telah terungkap, membawa teknologi sekuensing ini menjadi lebih hebatkemajuan. Beberapa pendekatan memaksimalkan jumlah base yang diurutkan dalam waktu singkat, menghasilkan banyak



Gambar 28. Alat The portable Mic qPCR system dari Bio Molecular Systems<sup>(77)</sup>



data yang dapat digunakan untuk memahami fenotipe yang kompleks. Selain itu, teknologi ini mampu mengurutkan potongan-potongan DNA bersebelahan yang lebih panjang, yang berguna membantu mengatasi struktur genom yang kompleks. Teknologi ini menyediakan berbagai pelengkap bagi peneliti dan klinisi (*clinicians*) untuk menyelidiki genom secara lebih mendalam dan peningkatan pemahaman bagaimana varian sekuen genom mendasari fenotipe dan penyakit <sup>(63)</sup>. Berikut berbagai aplikasi dari teknologi sekuensing, diantaranya:

a. *Sanger sequencing*

Salah satu teknologi sekuensing adalah *Sanger sequencing*, merupakan metoda sekuensing generasi pertama yang dikembangkan pada pertengahan tahun tujuh puluhan oleh Dr. Frederick Sanger. Teknologi ini dianggap sebagai *gold standard* sekuensing selama bertahun-tahun dan masih digunakan dalam banyak aplikasi. Metoda sekuensing ini digunakan dalam proyek genom manusia yang diselesaikan sekitar 20 tahun yang lalu. Meskipun akurasi tinggi, akan tetapi operasional dari metoda ini sangat mahal dan memakan waktu lama dibandingkan dengan teknologi sekuensing lain <sup>(44)</sup>.

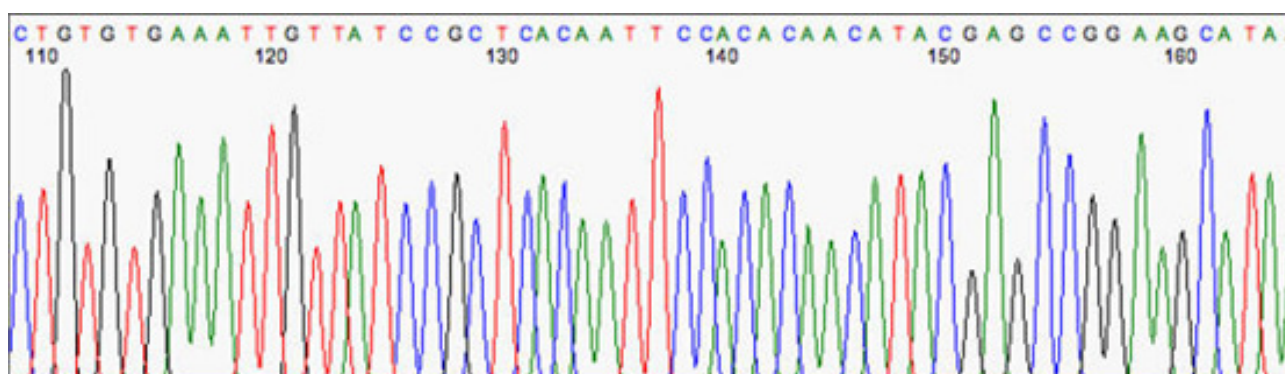
Seperti langkah-langkah yang terlibat dalam reaksi PCR standar, sekuensing *Sanger* bergantung pada DNA yang digunakan sebagai *template* untuk menghasilkan sekumpulan fragmen yang panjangnya berbeda satu sama lain oleh satu basa tunggal. Metoda ini

menghasilkan bacaan sekitar 500 bp <sup>(44)</sup>.

Untuk menemukan komposisi DNA yang tepat, reaksi membutuhkan titik henti yang jelas dalam proses ekstensi yang memberi tahu kita identitas basa terakhir pada fragmen DNA tertentu. Ini dicapai dengan menggunakan nukleotida termodifikasi yang disebut *dideoxynucleotides* (ddNTPs). Molekul-molekul ini tidak memiliki atom oksigen sehingga ketika digabungkan ke dalam rangkaian/sekuen pemanjangan, DNA polimerase tidak dapat lagi memanjang dari basa ini dan karenanya juga disebut sebagai nukleotida “pemutusan rantai”/“*chain-terminating*” nucleotides <sup>(44)</sup>.

Produk ekstensi kemudian dipisahkan oleh elektroforesis kapiler (*Capillary Electrophoresis/CE*). Mirip dengan elektroforesis gel standar dari PCR, di CE molekul disuntikkan oleh arus listrik ke tabung kapiler kaca panjang yang diisi dengan polimer gel. Medan listrik digunakan sehingga fragmen DNA bermuatan negatif bergerak menuju elektroda positif. Kecepatan molekul DNA berjalan melalui gel berbanding terbalik dengan berat molekulnya.

Masing-masing dari empat ddNTPs memiliki penanda *fluorescent* yang unik dan pada ujung tabung kapiler, sebuah laser menggertak fragmen DNA ketika mereka melewatinya. Fluoresensi yang dipancarkan dan ditangkap terdeteksi oleh sensor cahaya dan perangkat lunak kemudian dapat mengubah informasi ini menjadi sebuah *basecall*.



Gambar 29. Contoh *output trace* dari sebuah percobaan Sekuensing *Sanger*<sup>(8)</sup>

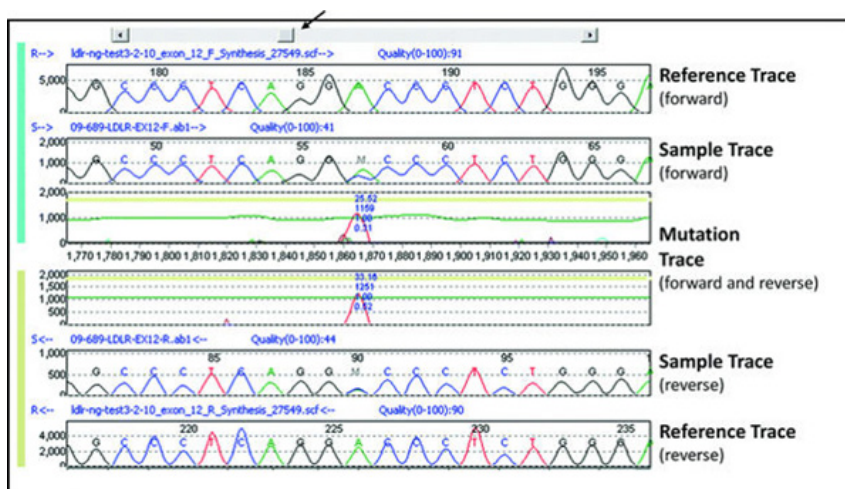
Jejak elektroferogram (*electropherogram trace*) yang dihasilkan dari sampel kemudian dapat dibandingkan dengan jejak dari referensi sekuen (atau *strain* tanpa mutasi yang diketahui). Sebelumnya, para peneliti menganalisis hasil ini secara manual dengan melalui basa demi basa untuk membandingkan jejak, tetapi saat ini analisisnya jauh lebih cepat dan sederhana dengan menggunakan perangkat lunak yang dapat secara otomatis mendeteksi perubahan apapun secara berurutan dengan tingkat akurasi yang tinggi.

b. Illumina

Selama sepuluh tahun terakhir industri sekuensing telah didominasi oleh Illumina, yang telah mengembangkan metoda *sequencing-by-sintesis*, juga disebut sebagai metoda sekuensing generasi kedua. Sampel DNA disiapkan dengan menambahkan

adapter, indeks (*barcode*) dan sekuen yang komplementer (pelengkap) terhadap *oligos* pada permukaan sel aliran yang memungkinkan kluster terbentuk sebelum sekuensing menggunakan nukleotida berlaboratoriumel fluoresens. Sinyal fluoesen tertentu yang dipancarkan bersama dengan intensitas sinyal menentukan panggilan dasar. Sekuensing illumina dapat menghasilkan pembacaan yang sangat akurat mulai dari 75-300 bp, tergantung pada jumlah siklus <sup>(18)</sup>.

Instrumen HiSeqX dan NovaSeq telah menetapkan standar untuk sekuensing hasil yang tinggi dan mampu menghasilkan ratusan juta pembacaan. Pada 2011 Illumina merilis instrumen MiSeq, menawarkan hasil yang lebih rendah dan perputaran cepat, yang ditujukan untuk laboratorium yang lebih kecil dan pasar diagnostik klinis.



Gambar 30. Membandingkan hasil dengan sekuen referensi untuk mengidentifikasi potensi mutasi <sup>(8)</sup>



Gambar 31. Alat Illumina MiSeq benchtop sequencer dari Illumina <sup>(82)</sup>

c. *Single Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing / Sekuensing Molekul Tunggal Real-Time*

Sekuensing SMRT oleh *Pacific Biosciences* (PacBio) adalah contoh lain dari teknologi generasi ketiga sekuensing pembacaan panjang (*long-read sequencing*). Sekuensing SMRT mampu menghasilkan pembacaan dengan panjang puluhan kilobases<sup>(42)</sup>.

Adaptor diikat ke DNA untai ganda untuk membentuk *template* lingkaran. Primer dan polimerase ditambahkan ke *library/database* dan sampel dimuat ke instrumen. Sekuensing terjadi pada sel SMRT yang berisi jutaan *tiny wells* yang disebut *Zero-Mode Waveguides* (ZMWs). Molekul DNA tunggal siap dimobilisasi menjadi ZMW, dengan polimerase terikat ke bagian bawah *well*. Sekuensing terjadi dengan menambahkan dNTP berfluoresensi untuk polimerase untuk digabungkan ke dalam untaian pemanjang. Saat setiap basa ditambahkan, sinyal unik dipancarkan yang digunakan untuk mengkarakterisasi basa DNA individu untuk menghasilkan *base calls*<sup>(42)</sup>.

d. *Nanopore Sequencing / Sekuensing Nanopore*

Sekuensing *nanopore* adalah *platform sequencing* generasi ketiga yang dikembangkan oleh *Oxford Nanopore Technologies*. Sekuensing nanopore DNA menjadi tersedia bagi para peneliti yang tertarik ketika perangkat MinION dikirim ke pengguna akses awal pada tahun 2014. Selama lima tahun ke depan, panjangnya pembacaan, portabilitas, hasil yang cepat dan biaya rendah dari Minion telah memungkinkan akses yang belum pernah terjadi sebelumnya ke sekuen basa DNA dan RNA dalam berbagai lingkungan, dari desa-desa terpencil Afrika selama epidemi Ebola<sup>(151,15)</sup>, ke Stasiun Luar Angkasa Internasional<sup>(19)</sup>, dan identifikasi metagenomik cepat dari patogen virus dalam sampel kilinik<sup>(66)</sup>. Selain itu, teknologi sekuensing *Nanopore* dengan cepat diperluas ke berbagai instrumen baik besar dan kecil, mulai dari *PromethION* yang dirancang untuk sekuen beberapa genom manusia per hari, ke *Flongle flow cell* sekali pakai, hingga *SmidgION* yang dapat digunakan dengan sebuah *smartphone*.



Gambar 32. Alat *PacBio Sequel II sequencer* dari *PacBio*<sup>(83)</sup>



Gambar 33. Perangkat Mini ON dengan *flow cell* dari Oxford Nanopore Technologies<sup>(78)</sup>

Secara singkat cara kerja dari perangkat ini adalah sebuah protein nanopore diatur dalam membran polimer tahan listrik. Arus ionik dilewatkan melalui nanopore dengan mengatur tegangan melintasi membran ini. Jika analit melewati pori-pori, ini menciptakan gangguan karakteristik dalam arus. Pengukuran gangguan dalam arus memungkinkan untuk mengidentifikasi basa-basatunggal dalam untai DNA atau RNA<sup>(147)</sup>.

Sekuensing nanopore memiliki beberapa keunggulan dibandingkan alat sequencing lainnya. Instrumen kecil seperti MinION dapat dijual dengan biaya di bawah US \$ 1.000, dibandingkan dengan \$ 19.900 untuk instrumen Illumina yang paling murah. Sejauh ini dilaporkan merupakan alat yang mampu membaca dengan panjang hingga jutaan bacaan yang berkelanjutan (*continuous million base reads*)<sup>(142, 97)</sup>. Yang penting, alat ini membaca DNA secara langsung daripada membutuhkan amplifikasi oleh PCR dimana informasi modifikasi basa hilang, dan sequensing *nanopore* dapat langsung membaca nukleobase dalam DNA dan RNA. Ini adalah satu-satunya pendekatan yang dapat dengan mudah dibuat sebagai perangkat portabel yang dihubungkan ke laptop pengguna. Kualitas ini membuat alat ini ideal untuk pekerjaan lapangan di lokasi terpencil<sup>(119)</sup>.

## V. KESIMPULAN

Resistensi antimikroba (AMR) telah menjadi ancaman bagi kesehatan manusia dan hewan dan kita bisa kembali ke masa dimana infeksi dan luka ringan bisa menyebabkan kematian akibat antimikroba tidak peka terhadap patogen. Uji identifikasi (ID) bakteri merupakan tahapan penting yang pertama dilakukan dalam kaitannya dengan resistensi antimikroba, dilanjutkan dengan uji kepekaan antimikroba (AST). Walaupun saat ini banyak teknologi canggih yang dikembangkan untuk uji ID dan AST, namun beberapa metoda konvensional seperti difusi cakram masih menjadi *gold standard* untuk uji AST, dan mikrodilusi merupakan *gold standard* EUCAST untuk penentuan KHM. Uji fenotipe AST secara umum mengetahui tingkat kepekaan hingga resistensi suatu antimikroba (antibiotika) tertentu terhadap mikroorganisme (bakteri) tertentu. Sementara, pengujian lebih lanjut terkait gen resistansi, mekanisme resistansi, lokasi dan mekanisme mutasi serta elemen-elemen genetik seperti plasmid dan transposon yang berperan penting menyebabkan bakteri menjadi resistan terhadap antibiotik dapat dikonfirmasi dengan uji genotipe.

## PUSTAKA

1. Abraham EP, Chain E, Fletcher CM... et al. 1941. Further observations on penicillin. *Lancet*, 238, 177–189.
2. Ambriz-Aviña V, Contreras-Garduño JA, Pedraza-Reyes M. 2014. Applications of Flow Cytometry to Characterize Bacterial Physiological Responses. *BioMed Res Int*.
3. Ayukekbong JA, Ntemgwa M, Atabe AN. 2017. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 6, 47.
4. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79.
5. Banaiee N, Bobadilla-Del-Valle M, Bardarov S Jr... et al. 2011. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Clin Microbiol.*;39:3883–8.
6. Bhowmick T, Mirrett S, Reller L, et al. Controlled multicenter evaluation of a bacteriophage-based method for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1226–30.
7. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 42–51.
8. Blane B, Harrison E, Coll F... et al. 2020. Online Course: Bacterial Genomes: Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens. Welcome Genome Campus in association with Future Learn. <https://coursesandconferences.wellcomegenomecampus.org/> (diunduh pada tanggal 4 Mei 2020).
9. Bobenchik AM, Deak E, Hindler JA... et al. 2015. Performance of Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* with Vitek 2 (2009 FDA) and 2014 CLSI breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 53: 816-823.
10. Bobenchik AM, Deak E, Hindler JA... et al. 2017. Performance of Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia* with Vitek 2 (2009 FDA) and CLSI M100S 26th Edition Breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 55:450-456.
11. Boedicker JQ, Li L, Kline TR... et al. 2018. Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics. *Lab Chip.* 8:1265–72.
12. Braff D, Shis D, Collins JJ. 2016. Synthetic biology platform technologies for antimicrobial applications. *Adv Drug Deliv Rev.*;105:35–43.
13. Breteler KB, Rentenaar RJ, Verkaart G... et al. 2011. Performance and clinical significance of direct antimicrobial susceptibility testing on urine from hospitalized patients. *Scand J Infect Dis.*;43:771–6.
14. Brogan DM. & Mossialos E. 2016. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. *Glob. Health* 12, 8.
15. Burton AS, Stahl SE, John KK... et al. 2020. Off Earth Identification of Bacterial Populations Using 16S rDNA Nanopore Sequencing. *Genes.* 11, 76.
16. Campbell J, McBeth C, Kalashnikov M... et al. 2016. Microfluidic Advances in Phenotypic Antibiotic Susceptibility Testing. *Biomed Microdevices.* 18(6): 103
17. Cantón R, Livermore DM, Morosini MI... et al. 2017. Etest® versus broth microdilution for ceftaroline MIC determination with *Staphylococcus aureus*: Results from PREMIUM, a European multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.*, 72, 431–436.
18. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA... et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6:1621–1624.
19. Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK... et al. 2017. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station. *Sci. Rep.* 7, 18022.
20. Charlton CL, Hindler JA, Turnidge J... et al. 2014. Precision of vancomycin and daptomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effect of subculture and storage. *J. Clin. Microbiol.* 52:3898-3905.
21. Chin CS, Alexander DH, Marks P... et al. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat. Methods* 10:563–569.
22. Choi J, Jong YG, Kim J... et al. 2013. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. *Lab Chip.* 13:280–7.
23. Choi J, Yoo J, Lee M, et al. 2014. A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis. *Sci Transl Med.*;6:267ra174.
24. Choi Y, Yau ST. 2009. Field-effect enzymatic amplifying detector with picomolar detection limit. *Anal Chem.*;81:7123–6.
25. Cira NJ, Ho JY, Dueck ME... et al. 2012. Loading microfluidic devices for determining the minimal inhibitory concentration of antibiotics. *Lab Chip.*;12:1052–9.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition.

- M7-A10. CLSI, Wayne, PA.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Twelfth Edition. CLSI, Wayne, PA.
  28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters: fourth edition. CLSI, Wayne, PA.
  29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved Guideline—3rd ed. CLSI document M23-A3. CLSI, Wayne, PA.
  30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—9th ed. CLSI document M2-A9. CLSI, Wayne, PA.
  31. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI document M100-S24. CLSI, Wayne, PA.
  32. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Verification of Commercial Microbial Identification and Susceptibility Test Systems, M52 Guideline. CLSI, Wayne, PA.
  33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-seventh Informational Supplement. M100S 27th Edition. CLSI, Wayne, PA.
  34. Cockerill FR. 1999. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 199–212.
  35. Collins AM, Craig G, Zaiman E... et al. 1954. A comparison between disk-plate and tube-dilution methods for antibiotic sensitivity testing of bacteria. *Can. J. Public Health/Rev. Can. Sante'e Publique*, 45, 430–439.
  36. Colvin HJ, Sherris JC. 1977. Electrical impedance measurements in the reading and monitoring of broth dilution susceptibility tests. *Antimicrob Agents Chemother.*;12:61–6.
  37. Coorevits L, Boelens J, Claeys G. 2015. Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*;34:1207–12.
  38. Costa-de-Oliveira S, Teixeira-Santos R, Silva AP, et al... 2017. Potential impact of flow cytometry antimicrobial susceptibility testing on the clinical management of Gram-negative bacteremia using the FASTinov® kit. *Front Microbiol.*;8:2455.
  39. Dailey PJ, Osborn J, Ashley EA... et al. 2019. Defining System Requirements for Simplified Blood Culture to Enable Widespread Use in Resource-Limited Settings. *Diagnostics* 9, 10.
  40. DePalma G, Turnidge J, Craig BA. 2017. Determination of disk diffusion susceptibility testing interpretive criteria using model-based analysis: development and implementation. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*87: 143-149.
  41. Dong T. & Zhao X. 2015. Rapid identification and susceptibility testing of uropathogenic microbes via immunosorbent ATP-bioluminescence assay on a microfluidic simulator for antibiotic therapy. *Anal. Chem.* 87, 2410–2418.
  42. Duncan DL, Patel NM. 2017. Next-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory “SMRT sequencing”. *Diagn. Mol. Pathol.* 25-33.
  43. Dusthacker A, Kumar V, Subbian S... et al. 2018. Construction and evaluation of luciferase reporter phages for the detection of active and non-replicating tubercle bacilli. *J Microbiol Methods.*;73:18–25.
  44. Ebili HO, James C. Hassall... et al. 2017. “Squirrel” Primer-Based PCR Assay for Direct and Targeted Sanger Sequencing of Short Genomic Segments. *J. Biomol. Tech.* 28(3): 97–110.
  45. Elavarasan T, Chhina SK, Ash MP... et al. 2013. Resazurin reduction based colorimetric antibiogram in microfluidic plastic chip. *Sens. Actuators B Chem.* 176, 174–180.
  46. Engstrom A, Gomez de la T, Stromme M... et al. 2013. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by padlock probes and magnetic nanobead-based readout. *PLoS One.*;8:e62015.
  47. Ertl P, Wagner M, Corton E... et al. 2003. Rapid identification of viable *Escherichia coli* subspecies with an electrochemical screen-printed biosensor array. *Biosens Bioelectron.*;18:907–16.
  48. Etayash H, Khan MF, Kaur K... et al. 2016. Microfluidic cantilever detects bacteria and measures their susceptibility to antibiotics in small confined volumes. *Nature Communications* 7:12947
  49. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2021. Clinical breakpoints. Terdapat dalam [https://eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://eucast.org/clinical_breakpoints/) (diunduh pada 28 April 2021).
  50. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2017. Guidelines for detection of resistance patterns. Terdapat dalam here: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf) (diunduh pada 28 April 2021).
  51. Falagas ME. & Karageorgopoulos DE. 2019. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms. *J. Hosp. Infect.* 73, 345–354.

52. Felmingham D. & Brown DF. 2011. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 81–85.
53. Fisher RA. 1992. Statistical methods for research workers. In Breakthroughs in Statistics; Springer, Oliver & Boyd: New York, NY, USA, pp. 66–70.
54. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. 2011. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol Rev.* 14(4):836–871.
55. Forero DA, González-Giraldo Y, Castro-Vega LJ... et al. 2019. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *Biotechniques* 67(4): 192-199.
56. Fredborg M, Andersen KR, Jorgensen E... et al. 2013. Real-time optical antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.*;51:e8609.
57. Fredborg M, Rosenvinge F, Spillum E... et al. 2015. Rapid antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates by digital time-lapse microscopy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*;34:2385–94.
58. Frosch M, Maiden MCJ. 2006. Handbook of Meningococcal Disease: Infection Biology, Vaccination, Clinical Management; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA.
59. Frye JG, Lindsey RL, Rondeau G... et al. 2010. Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database. *Microb. Drug Resist.* 16, 9–19.
60. Gerard DW. 2011. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem. Commun*,47: 4055–4061.
61. Gfeller KY, Nugaeva N, Hegner M. 2015. Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of *Escherichia coli*. *Biosens Bioelectron.* 21:528–33.
62. Godin M, Delgado FF, Son S... et al. 2010. Using buoyant mass to measure the growth of single cells. *Nat Methods.* 7:387–90.
63. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17: 333–351.
64. Green AA, Silver PA, Collins JJ. 2014. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. *Cell.*;159:925–39.
65. Greenwood M. & Yule GU. 1917. On the statistical interpretation of some bacteriological methods employed in water analysis. *J. Hyg.* 16, 36.
66. Greninger AL, Naccache SN, Federman S... et al. 2015. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Med.* 7: 99.
67. Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S... et al. 2015. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 531–539.
68. Guardino RF. 2015. Early History of Microbiology and Microbiological Methods; Parenteral Drug Association: Wilmington, DE, USA.
69. Hannah S, Dobrea A, Lasserre P... et al. 2020. Development of a Rapid, Antimicrobial Susceptibility Test for *E. coli* Based on Low-Cost, Screen-Printed Electrodes. *Biosensors*, 10, 153.
70. Hanninen PE, Soukka J, Soini JT. 2018. Two-photon excitation fluorescence bioassays. *Ann N Y Acad Sci.*1130:320–6.
71. Hariharan H, Sharma S, Chikweto A. 2019. Antimicrobial drug resistance as determined by the E-test in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolates from the ceca of broiler and layer chickens in Grenada. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 21–28.
72. Hawser S. 2012. Surveillance programmes and antibiotic resistance: worldwide and regional monitoring of antibiotic resistance trends. *Handb. Exp. Pharmacol.* 211: 31–43.
73. Hayden RT, Clinton LK, Hewitt C... et al. 2016. Rapid antimicrobial susceptibility testing using forward laser light scatter technology. *J Clin Microbiol.*;54:2701–6.
74. Houpiqian P, Raoult D. 2002 Traditional and Molecular Techniques for the Study of Emerging Bacterial Diseases: One Laboratory's Perspective. *Emerg Infect. Dis.* 8(2): 122–131.
75. Hrabák J, Chudáčková E, Walková R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26, 103–114.
76. <http://www.medwow.com/med/microbiological-culture-analyzer/siemens/walkaway-40-plus-system/38032.model-spec> (diunduh pada tanggal 28 April 2021).
77. <https://biomolecularsystems.com/mic-qpcr/> (diunduh pada tanggal 28 April 2021).
78. <https://store.nanoporetech.com/flowcells.html>(diunduh pada tanggal 28 April 2021).
79. <https://www.bd.com/en-uk/products/diagnostics-systems/identification-and-susceptibility-systems/phoenix> (diunduh pada tanggal 28 April 2021).
80. <https://www.biomerieux-usa.com/vitek-2>(diunduh pada tanggal 28 April 2021).
81. <https://www.bio-rad.com/en-id/product/t100-thermal-cycler?ID=LZJU45E8Z>(diunduh pada tanggal 28 April 2021).
82. <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>(diunduh pada tanggal 28 April 2021).
83. <https://www.pacb.com/products-and-services/sequel-system/latest-system-release/>(diunduh

- pada tanggal 28 April 2021).
84. <https://www.tainstruments.com/tam-48/> (diunduh pada tanggal 28 April 2021).
  85. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A43183#/A43183> (diunduh pada tanggal 28 April 2021).
  86. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V3090#/V3090> (diunduh pada tanggal 28 April 2021).
  87. Huang AH, Wu JJ, Weng YM... et al. 1998. Direct antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacilli in blood cultures by an electrochemical method. *J Clin Microbiol.*;36:2882–6.
  88. Huang TH, Ning X, Wang X, et al... 2015. Rapid cytometric antibiotic susceptibility testing utilizing adaptive multidimensional statistical metrics. *Anal Chem.*;87:1941–9.
  89. Huang WL, Hsu ZJ, Chang TC... et al. 2014. Rapid and accurate detection of rifampin and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis using an oligonucleotide array. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O542–O549.
  90. Humphries RM, Hindler JA, Epton E... et al. 2017. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) detection practices in California: What are we missing? *Clin Infect Dis.*
  91. Humpries RM, Kircher S, Ferrel A... et al. 2018. The Continued Value of Disk Diffusion for Assessing Antimicrobial Susceptibility in Clinical Laboratories: Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group, *J. Clin. Microbiol.* 2018, 56 (8): 1-10.
  92. International Organization for Standardization (ISO). 2009. ISO 31000: Risk management – Principles and guidelines. ISO, Geneva, Switzerland: 24.
  93. International Organization for Standardization (ISO). 2006. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems– susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices–part 2: evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. ISO 20776–2. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
  94. International Organization for Standardization (ISO). 2006. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antibiotic.
  95. International Organization for Standardization (ISO). 2016. Clinical laboratory testing - criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing.
  96. Ivancic V, Mastali M, Percy N... et al. 2008. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1213–1219.
  97. Jain M, Koren S, Miga KH... et al. 2018. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. Biotechnol.* 36: 338–345.
  98. Jin WY, Jang SJ, Lee MJ... et al. 2011. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 70:442–7.
  99. Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2019. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1749–1755.
  100. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA... et al. 1999. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion Methods. In *Manual of Clinical Microbiology*; Geo. F. Brooks Publisher: Washington, DC, USA.
  101. Joyce LF, Downes J, Stockman K... et al. 1992. Comparison of five methods, including the PDM Epsilon meter test (E test), for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2709–2713.
  102. Jung J, Eberl T, Sparbier K... et al. 2014. A. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 949–955.
  103. Kalashnikov M, Lee JC, Campbell J... et al. 2012. A microfluidic platform for rapid, stress-induced antibiotic susceptibility testing of *Staphylococcus aureus*. *Lab Chip* 12, 4523–4532.
  104. Karlowsky, J.A.; Richter, S.S. Antimicrobial susceptibility testing systems. In *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed.; American Society of Microbiology: Sterling, VA, USA, 2015; pp. 1274–1285.
  105. Kassim A, Omuse G, Premji Z... et al. 2016. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: A cross-sectional study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 15, 21.
  106. Kaur J, Chopra S, Sheevani. 2013. Modified Double Disc Synergy Test to Detect ESBL Production in Urinary Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin. Diagn. Res.* 7(2): 229–233.
  107. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. 2019. Current and Emerging Methods of Antibiotic



- Susceptibility Testing. *Diagnostics*. 9(49): 1-17.
- 108 Khot PD, Fishera MA. 2013. Novel Approach for Differentiating *Shigella* Species and *Escherichia coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbio.* 51 (11): 3711–3716.
- 109 Koskinen JO, Stenholm T, Vaarno J, et al. 2008. Development of a rapid assay methodology for antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;62:306–16.
- 110 Koskinen JO, Stenholm T, Vaarno J... et al. 2008. Development of a rapid assay methodology for antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;62:306–16.
- 111 Kumar A, Arora V, Bashamboo A... et al. 2012. Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction: implications in diagnosis of typhoid fever. *Infect. Genet. Evol.* 2(2):107-110.
- 112 Lalitha M. 2004. Manual on antimicrobial susceptibility testing. In Performance Standards for Antimicrobial Testing: Twelfth Informational Supplement; CLSI: Wayne, PA, USA, Volume 56238, pp. 454–456.
- 113 Lee J, Shen W, Payer K... et al. 2010. Toward attogram mass measurements in solution with suspended nanochannel resonators. *Nano Lett.*;10:2537–42.
- 114 Lee M, Chung HS. 2015. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. *J Microbiol Methods*, 112: 87-91.
- 115 Li Y, Yang X, Zhao W. 2017. Emerging microtechnologies and automated systems for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing. *SLAS Technol.* 22:585–608.
- 116 Liu T, Lu Y, Gau V... et al. 2014. Rapid antimicrobial susceptibility testing with electrokinetic enhanced biosensors for diagnosis of acute bacterial infections. *Ann. Biomed. Eng.* 42, 2314–2321.
- 117 Liu T, Lu Y, Gau V... et al. 2014. Rapid antimicrobial susceptibility testing with electrokinetics enhanced biosensors for diagnosis of acute bacterial infections. *Ann. Biomed. Eng.* 42, 2314–2321.
- 118 Liu ZK, Ling TK, Cheng AF. 2015. Evaluation of the BD Phoenix Automated Microbiology System for identification and antimicrobial susceptibility testing of common clinical isolates. *Med Princ Pract.* 14:250–4.
- 119 Loose M, Malla S, Stout M. 2016. Real-time selective sequencing using nanopore technology. *Nat. Methods*, 13: 751–754.
- 120 Luo J, Wang J, Mathew AS... et al. 2016. Ultrasensitive detection of *Shigella* species in blood and stool. *Anal Chem.*;88:2010–4.
- 121 MacDonald IC, Deans TL. 2016. Tools and applications in synthetic biology. *Adv Drug Deliv Rev.*;105:20–4.
- 122 Marques SM & Esteves da Silva JC. 2009. Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* 61, 6–17.
- 123 Martínez JL. 2008. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* 321: 365–367.
- 124 Maurer FP, Christner M, Hentschke M. 2017. Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. *Infect Dis Rep.* 9:6839.
- 125 McCrady M. 1918. Tables for rapid interpretation of fermentation-tube results. *Public Health J.* 9, 201–220.
- 126 Melissa R. Nyendak, Lewinsohn DA... et al. 2009. New Diagnostic Methods for Tuberculosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 22(2): 174–182.
- 127 Menon V, Lahanas S, Janto C... et al. 2016. Utility of direct susceptibility testing on blood cultures: is it still worthwhile? *J Med Microbiol.*;65:501–9.
- 128 Mercante JW, Jonas M. Winchell JM. 2015. Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clin Microbio Rev.* 28 (1): 95-113.
- 129 Mezger A, Gulberg E, Goransson J. 2015. A general method for rapid determination of antibiotic susceptibility and species in bacterial infections. *J Clin Microbiol.*;53:425–32.
- 130 Miller SA, Karichu J, Kohner P... et al. 2017. Multicenter Evaluation of a Modified Cefoxitin Disk Diffusion Method and PBP2a Testing To Predict mecA-Mediated Oxacillin Resistance in Atypical *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 55: 485-494.
- 131 Mohan R, Sanpitakseree C, Desai AV... et al. 2015. A microfluidic approach to study the effect of bacterial interactions on antimicrobial susceptibility in polymicrobial cultures. *RSC Adv.* 5, 35211–35223.
- 132 Mortensen J, Bernier M, Gray LD... et al. 2015. New quality control strain for use in routine testing for production of extended-spectrum beta-lactamases by *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 43(5): 2545.

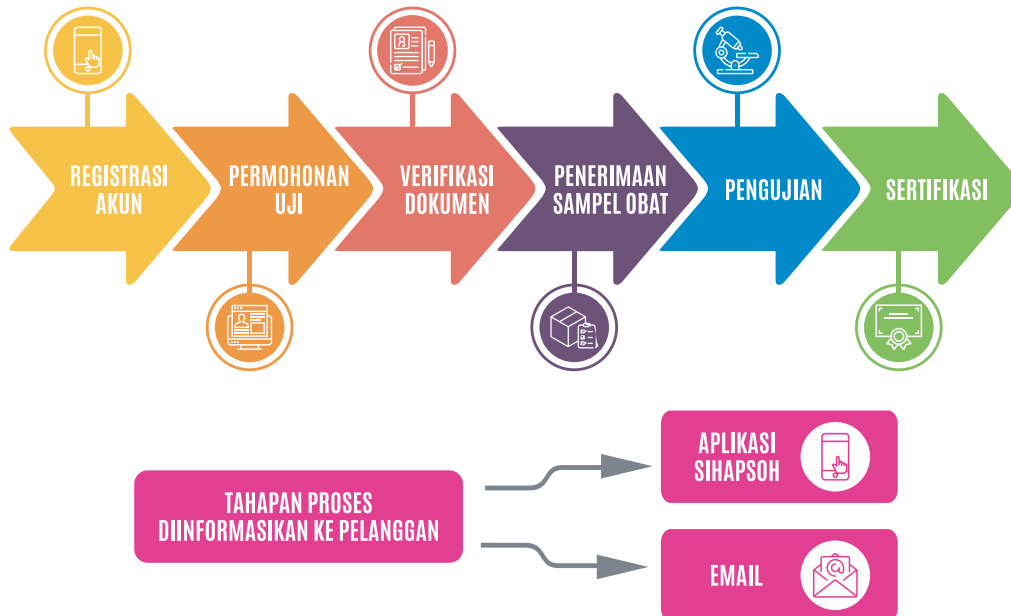
- 133 ational Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2001. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters; Approved Guideline, Second Edition. Wayne, PA.
- 134 Nichols JH. 2011. Laboratorium quality control based on risk management. *Ann. Saudi. Med.* 31(3): 223–228.
- 135 Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M... et al. 1994. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science.*;265:2085–8.
- 136 Oaks AR, Badger R, Grove DI. 1994. Comparison of direct and standardized testing of infected urine for antimicrobial susceptibility by disk diffusion. *J Clin Microbiol.*;32:40–5.
- 137 OIE. 2021. Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. *OIE Terrestrial Animal Health Code*:1-11.
- 138 Olsson O, Konez C, Szalay AA. 1988. The use of the *luxA* gene of the bacteriophage luciferase operon as a reporter gene. *Mol Gen Genet.*;215:1–9.
- 139 Opota O, Croxatto A, Prod'hom G... et al. 2015. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect.*;21:313–2.
- 140 Otero F, Santiso R, Tamayo M... et al. 2017. Rapid detection of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria through assessment of changes in cellular morphology. *Microb Drug Resist.*;23:157–62.
- 141 Paton R. 2000. Vitek automated identification and susceptibility testing system: introduction into a busy clinical bacteriology laboratory. *Br J Biomed Sci.* 57:307–12.
- 142 Payne A, Holmes N, Vardhman Rakyan V... et al. 2019. BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files, *Bioinformatics* 35(130): 2193–2198.
- 143 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C. 2003. WHO Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
- 144 Perry JD. 2017. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin. Microbio.Rev.* 30(2), 449–479.
- 145 Phelps EB. 1908. A method of calculating the numbers of *B. coli* from the results of dilution tests. *Am. J. Public Hyg.* 18, 141.
- 146 Picard J. 1990. Applied Veterinary Bacteriology and Mycology: Bacteriological Techniques; University of Pretoria, Afrivip: Pretoria, South Africa.
- 147 Pomerantz A, Penafiel N, Arteaga A... et al. 2018. Real-time DNA barcoding in a rainforest using nanopore sequencing: Opportunities for rapid biodiversity assessments and local capacity building. *Gigasci* 7: 33.
- 148 Poupard JA, Rittenhouse SF, Walsh LR. 1994. The evolution of antimicrobial susceptibility testing methods. In Antimicrobial Susceptibility Testing; Springer, Plenum Publishing: New York, NY, USA; pp. 3–14.
- 149 Puttaswamy S, Lee BD, Amighi B... et al. 2012. Novel electrical method for the rapid determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and assay of bactericidal/bacteriostatic activity. *J Biosens Bioelectron.*;S2:003.
- 150 Quick J, Ashton P, Calus S... et al. 2015. Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of *Salmonella*. *Genome Biol.* 16: 114.
- 151 Quick J, Loman N, Duraffour S... et al. 2016. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530: 228–232.
- 152 Reed J. 1925. Report of Advisory Committee on Official Water Standards; Public Health Reports; Sage Publications, Inc.: Teller Road, AK, USA, Volume 40.
- 153 Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH... et al. 2019. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1749–1755.
- 154 Richard C, Tim K, John Q. 2005. Gram Straining. *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley and Sons, Inc. 1-2.
- 155 Richter, S.S.; Ferraro, M.J. 2011. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In Manual of Clinical Microbiology, 10th ed.; American Society of Microbiology: Sterling, VA, USA,; pp. 1144–1154.
- 156 Rieder RJ, Zhao Z, Zavizion B. 2019. New approach for drug susceptibility testing: monitoring the stress response of mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*;53:4598–603.
- 157 Rittenberg SC. 1965. Three Centuries of Microbiology. Hubert, A. Lechevalier and Morris Solotorovsky. McGraw-Hill, New York. *Science*, 149, 530–531.
- 158 Ruangpan L. & Tendencia EA. (2014). Bacterial isolation, identification and storage. In Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment, SEAFDEC/AQD's Institutional Repository, 3–11.

- 159 Sader HS, Pignatari AC. 1994. E test: A novel technique for antimicrobial susceptibility testing. *Sao Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* 112, 635–638.
- 160 Safavieh M, Pandya HJ, Venkataraman M... et al. 2017. Rapid Real-Time Antimicrobial Susceptibility Testing with Electrical Sensing on Plastic Microchips with Printed Electrodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 12832–12840.
- 161 Sageerabanoo S, Malinu A, Mangaiyarkarasi T... et al. 2015. Phenotypic detection of extended spectrum B-lactamase and Amp-C B-lactamase producing clinical isolates in a Tertiary Care Hospital: A preliminary study. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 6, 383–387.
- 162 Sanchez ML. & Jones RN. 1992. E test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiologic application. *Antimicrob. Newsl.* 8, 1–7.
- 163 Sellenriek P, Holmes J, Ferrett R... et al. 2015. Comparison of MicroScanWalk-Away®, Phoenix. and VITEK-TWO® Microbiology systems used in the identification and susceptibility testing of bacteria. In Proceedings of the Abstr 105th General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, GA, USA, 5–9 June 2005.
- 164 Sengupta S, Battigelli DA, Chang HC. 2016. A micro-scale multi-frequency reactance measurement technique to detect bacterial growth at low bio-particle concentrations. *Lab Chip.*;6:682–92.
- 165 Shi X, Kadiyala U, VanEpps JS... et al. 2018. Culture-free bacterial detection and identification from blood with rapid, phenotypic, antibiotic susceptibility testing. *Sci Rep.*;8:3416.
- 166 Shirai H, Nishibuchi M, Ramamurthy T... et al. 1991. Polymerase Chain Reaction for Detection of the *Cholera* Enterotoxin Operon of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 29(11): 2517–2521.
- 167 Slomovic S, Pardee K, Collins JJ. 2015. Synthetic biology devices for in vitro and in vivo diagnostics. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;112:14429–35.
- 168 Soini JT, Soukka J, Soini AE... et al. 2000. Two-photon fluorescence excitation in detection of biomolecules. *Biochem Soc Trans.*;28:70–4.
- 169 Staneck JL, Allen SD, Harris EE... et al. 1988. Rapid MIC testing with the sensititre autoreader. *J Clin Microbiol.* 26:1–7.
- 170 Steen HB, Lindmo T. 1979. Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone. *Science.*;204:404.
- 171 Steen HB, Skarstad K, Boye E. 1986. Flow cytometry of bacteria: cell cycle and effects of antibiotics. *Ann N Y Acad Sci.*:329–38.
- 172 Stefaniuk E, Baraniak A, Gniadkowski M. 2013. Evaluation of the BD Phoenix automated identification and susceptibility testing system in clinical microbiology laboratory practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22:479–85.
- 173 Stratton CW. 2018. Advance Technique. In Diagnostic Microbiology. Volume 1: Technique, Advanced Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Methods. Pp 69-98.
- 174 Syal K, Mo M, Yu H... et al. 2017. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics.* 7:1795–805.
- 175 Takagi R, Fukuda J, Nagata K... et al. 2013. A microfluidic microbial culture device for rapid determination of the minimal inhibitory concentration of antibiotics. *Analyst.*;138:1000–3.
- 176 Tan TY, Ng SY. 2017. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin. Microbiol. Infect.*13: 541–544.
- 177 Tang Y, Zhen L, Liu J... et al. 2013. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. *Anal Chem.*;85:2787–94.
- 178 Tevere VJ, Hewitt PL, Dare A... et al. 1996. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR Amplification with Pan-*Mycobacterium* Primers and Hybridization to an *M. tuberculosis*-Specific Probe. *J. Clin. Microbiol.* 34(4): 918–923.
- 179 Turnidge J, Paterson DL. 2017. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin. Microbiol. Rev.* 20(3): 391–408.
- 180 Ur A, Brown DFJ. 1975. Impedance monitoring of bacterial activity. *J Med Microbiol.*;7:466–80.
- 181 Van Belkum A. & Dunne WM Jr. 2013. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 51:2018–24.
- 182 van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A... et al. 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.*14: 742–750.
- 183 van Dyck E, Leven M, Pattyn S... et al. 2011. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Enzyme Immunoassay, Culture, and Three Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Clin. Microbiol.* 39 (5): 1756-1756.
- 184 van Dyck E, Smet H, Piot P. 1994. Comparison of E test with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1586–1588.

- 185 van Griethuysen A, Pouw M, van Leeuwen N. 1999. Rapid Slide Latex Agglutination Test for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 37(9): 2789–2792.
- 186 van Hal SJ, Barbagiannakos T, Jones M... et al. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2284–2287.
- 187 van Leeuwen WB, van Pelt C, Lujendijk A... et al. 1999. Rapid Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates by the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *J. Clin. Microbiol.* 37(9): 3029–3030.
- 188 Von Ah U, Wirz D, Daniels AU... et al. 2009. Isothermal micro calorimetry – a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.*;9:106.
- 189 Waites KB, Duffy LB, Bébéar CM... et al. 2012. Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3542–3547.
- 190 Wang J, Yau ST. 2011. Field-effect amperometric immuno-detection of protein biomarker. *Biosens Bioelectron.*;29:210–4.
- 191 Webb JS, Barratt SR, Sabev H... et al. 2011. Green fluorescent protein as a novel indicator of antimicrobial susceptibility in *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5614–5620.
- 192 Webster TA, Sismaet HJ, Goluch ED. 2015. Electrochemically monitoring the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Analyst* 140, 7195–7201.
- 193 Wei TY, Cheng CM. 2016. Synthetic biology-based point-of-care diagnostics for infectious disease. *Cell Chem Biol.*;23:1056–66.
- 194 Wellinghausen N, Pietzcker T, Poppert S... et al. 2017. Evaluation of the Merlin MICRONAUT System for Rapid Direct Susceptibility Testing of Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 45, 789–795.
- 195 Wheat PF. 2011. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 1–4.
- 196 Wilkinson KM, Winstanley TG, Lanyon C... et al. 2012. Comparison of Four Chromogenic Culture Media for Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 50(9): 3102–3104.
- 197 Winstanley T. & Courvalin P. 2011. Expert systems in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 24:515–56.
- 198 Wong W, Farr R, Joglekar M... et al. 2015. Probe-based Real-time PCR Approaches for Quantitative Measurement of microRNAs. *J. Vis. Exp.* (98), 1-12.
- 199 World Health Organization. 1961. Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests: Second Report of the Expert Committee on Antibiotics [Meeting Held in Geneva from 11 to 16 July 1960]; WHO: Geneva, Switzerland.
- 200 World Health Organization. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. Terdapat dalam <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (diunduh pada 28 April 2021).
- 201 Wright DN, Matsen JM, DiPersio JR... et al. 1989. Evaluation of four newer antimicrobial agents in the Avantage susceptibility test system. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2381–2383.
- 202 Wu JJ, Huang AH, Dai JH... et al. 1997. Rapid detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in blood cultures by an impedance method. *J Clin Microbiol.*;35:1460–4.
- 203 Xu Z, Hou Y, Peters BM... et al. 2016. Chromogenic media for MRSA diagnostics. *Mol Bio. I Rep.* 43(11): 1205-1.
- 204 Yee R & Simner PJ. 2019. Next-Generation Sequencing Approaches to Predicting Antimicrobial Susceptibility Testing Results. *Adv. in Mol. Pathol* 2: 99–110.
- 205 Zavizion B, Zhao Z, Nittayajarn A... et al. 2010. Rapid microbiological testing: monitoring the development of bacterial stress. *PLoS One.*;5:e13374.
- 206 Zimmermann, S.; Burckhardt, I. 2017. Development and Application of MALDI-TOF for Detection of Resistance Mechanisms. In *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*; JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA,; pp. 231–248.



**PROSES PELAYANAN PENGUJIAN ONLINE APLIKASI SIHAPSOH (SISTEM INFORMASI HASIL PENGUJIAN & SERTIFIKASI OBAT HEWAN)**





**BALAI BESAR PENGUJIAN MUTU DAN SERTIFIKASI OBAT HEWAN**

Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian

Jl. Raya Pembangunan Gunung Sindur Bogor 16340 Indonesia - Email : [bbpmsoh@pertanian.go.id](mailto:bbpmsoh@pertanian.go.id) - telepon : 62-21-7560489 - Fax : 62-21-7560466

<https://bbpmsoh.ditjenpkh.pertanian.go.id>

 [@bbpmsohgunungsindur](#)  [@bbpmsoh\\_](#)  [@bbpmsoh1](#)  [BBPMSOH Gunungsindur](#)

