



KEMENTERIAN PERTANIAN

BULETIN PENGUJIAN MUTU OBAT HEWAN

No : 32 Tahun 2023

ISSN : 0852-9612

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

2023

ISSN : 0852-9612

BULETIN PENGUJIAN MUTU OBAT HEWAN

Nomor : 32, Tahun 2023

Diterbitkan oleh :

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikat Obat Hewan
Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan
Kementerian Pertanian

Alamat :

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikat Obat Hewan
Jl. Pembangunan, Gunungsindur, Bogor - 16340
Telepon : 021.7560489, 75871676
Fax : 021.7560466
E-mail : bbpmsoh@pertanian.go.id
Website : bbpmsoh.ditjenpkh.pertanian.go.id

Dewan Redaksi

Penanggung Jawab : Dr. drh. Kresno Suharto, M.P
Redaktur : Dr. drh. Ketut K.N. Natih, M.Si
Editor : Muhammad Zahid, S.Si., Apt., M.Sc.
Editor : drh. Maria Fatima Palupi, M.Si.
Editor : drh. Ernes Andesftha, M.Si
Desain Grafis : Anis Laila Sari., S.Kom

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.32 Tahun 2023. 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 dan Pemantauan Mutu Obat Hewan Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) serta Monitoring dan Evaluasi Pascavaksinasi Penyakit Mulut dan Kuku (PMK). Buletin terbitan kali ini membahas terkait pemantauan mutu obat hewan dalam rangka mendukung gratieks, kajian korelasi antara angka uji kelembaban terhadap kandungan virus vaksin aktif. Selain artikel terkait validasi metode uji sebagai bagian dari jaminan hasil pengujian mutu obat hewan.

Dalam edisi 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. Artikel yang dimuat didalam buletin terkait hal tersebut adalah Kajian Aspek Keamanan pada Sampel Obat Hewan Probiotik yang Mengandung Bakteri *Enterococcus*.

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, Agustus 2023
Pimpinan Redaksi

KATA SAMBUTAN

Dalam beberapa tahun terakhir Indonesia menghadapi serangan berbagai penyakit hewan menular seperti *African Swine Fever* (ASF), Penyakit Mulut dan Kuku (PMK), dan *Lumpy Skin Disease* (LSD) yang berdampak pada masalah kesehatan hewan maupun stabilitas ekonomi. Berbagai macam cara telah dilakukan pemerintah untuk mengendalikan penyakit hewan menular tersebut dengan meningkatkan sistem biosekuritas di peternakan, perbatasan, dan lalu lintas ternak, pengobatan, edukasi kepada masyarakat, hingga program vaksinasi. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) ikut berperan penting dalam membantu pemerintah mengendalikan penyakit hewan menular, dengan menjamin mutu obat hewan yang beredar di Indonesia, sehingga obat hewan yang digunakan memiliki efektifitas dalam mencegah dan mengobati penyakit.

Pada perjalanannya BBPMSOH telah menjadi laboratorium rujukan untuk pengujian mutu vaksin hewan tingkat ASEAN sejak tahun 1998. Pengakuan sebagai laboratorium rujukan untuk pengujian mutu vaksin di tingkat ASEAN yang terbaru ditetapkan pada pertemuan ASEAN *Minister on Agriculture and Forestry* (AMAF) pada November 2020 dengan dikeluarkannya sertifikat ASEAN *Recognition of Reference Laboratories for Animal Vaccine Testing*.

Untuk mendukung salah satu tugas dan fungsinya, BBPMSOH melaksanakan pemantauan dan pengkajian mutu obat hewan yang bertujuan untuk memantau mutu obat hewan yang beredar (*postmarket*) dan mengkaji efek samping obat di lapangan (*farmakovigilans*). Hasil monitoring dan kajian tersebut perlu didiseminasikan kepada masyarakat luas umumnya serta masyarakat veteriner pada khususnya. Oleh karena itu Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan hadir sebagai media untuk penyebarluasan informasi dan Karya Tulis Ilmiah (KTI) yang diharapkan dapat memberi manfaat bagi Kesehatan hewan.

Bogor, Agustus 2023

Kepala Balai Besar,



Dr. drh. Kresno Suharto, MP.

NIP. 196308071991031002

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
KATA SAMBUTAN.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
1. MONITORING DAN EVALUASI PASCAVAKSINASI PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK) TAHUN 2022.....	1
<i>Muhammad Zahid, Irma Rahayuningtyas, Ramlah, Nur Khusni Hidayanto, Rahajeng Setiawaty, Emilia, Ketut Karuni Nyanakumari Natih , Lilis Sri Astuti</i>	
2. KAJIAN ASPEK KEAMANAN PADA SAMPEL OBAT HEWAN PROBIOTIK YANG MENDUNG BAKTERI <i>ENTEROCOCCUS</i>	16
<i>Ernes Andesfha, Dina Kartini, Febrina H Hariandja, Derra Apriliyani, Sri Arofah, Citra Patrianegari, Sarji</i>	
3. PENGUJIAN MUTU DAN EFEKTIFITAS SERTA EVALUASI VAKSIN RABIES WRD-0012021	37
<i>Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Rahajeng Setiawaty, Neni Nuryani, Dewi Astuti</i>	
4. VALIDASI METODE UJI POTENSI ANTIBIOTIK SPEKTINOMISIN SERBUK DENGAN KUMAN UJI <i>ESCHERICHIA COLI NIHJ</i>.....	46
<i>Novida Ariyani, Maria Fatima Palupi, Nurhidayah, Indriyana, Anna Miftahul Jannah</i>	
5. KAJIAN RESPON IMUN AYAM PETELUR PASCAVAKSINASI AVIAN INFLUENZA (AI) DI DELAPAN PROVINSI DI INDONESIA TAHUN 2022	56
<i>Ramlah, Nur Khusni Hidayanto, Sri Suryanti, Yati Suryati</i>	
6. PENGKAJIAN MUTU ANTIBIOTIK GOLONGAN KUINOLON TAHUN 2023	64
<i>Siti Khomariyah, Maria Fatima Palupi, Rosana Anita Sari, Emi Rusmiati, Nafisah Indrishanty, Fika Asti Fanani, Ambarwati, Novida Ariyani, Nurhidayah, Indriyana, Anna Miftahul Jannah</i>	

MONITORING DAN EVALUASI PASCAVAKSINASI PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK) TAHUN 2022

¹Muhammad Zahid*, ²Irma Rahayuningtyas, ²Ramlah, ²Nur Khusni Hidayanto, ²Rahajeng Setiawaty, ¹Emilia,
¹Ketut Karuni Nyanakumari Natih, ¹Lilis Sri Astuti

¹Pelayanan Sertifikasi Pengembangan Mutu dan Kerjasama
²Unit Uji Virologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340
*email: zahid.achmad@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit mulut dan kuku (PMK) adalah penyakit virus yang sangat menular pada hewan, umumnya menjangkiti hewan berkuku belah/genap, termasuk sapi, kerbau, unta, domba, kambing, rusa, dan babi. Penyakit ini kembali muncul di Indonesia dan pertama kali teridentifikasi di daerah sekitar pinggiran utara dan barat Surabaya, Provinsi Jawa Timur pada April 2022. Program monitoring dan evaluasi pascavaksinasi PMK bertujuan untuk memastikan efektivitas dari vaksinasi individu dan membentuk kekebalan kelompok terhadap virus PMK. Serum pascavaksinasi PMK diperoleh dari 24 provinsi terdampak PMK, meliputi 66 lokasi sampling dengan minimal 73 sampel untuk masing-masing lokasi. Total sampel yang diperoleh sebanyak 5.119 sampel (110,80%) dari target 5.160 sampel. Hasil pengujian serologik dengan Metode ELISA SP (protein struktural) terhadap serum yang diperoleh menunjukkan bahwa rata-rata 97,20% hewan target (sapi) yang divaksin PMK memberikan respon pembentukan antibodi (positif) terhadap virus PMK, sebanyak 2,21% tidak terbentuk antibodi (negatif), dan dubious sebesar 0,59% dari 66 lokasi sampling tersebut. Bahkan ada 19 dari 66 kabupaten/kota (28,80%) yang diperoleh serumnya menunjukkan 100% terbentuknya antibodi terhadap virus PMK. Penerapan rantai dingin, secara keseluruhan Unit Pelaksana Teknis (UPT) yang membidangi peternakan dan kesehatan hewan telah menerapkan rantai dingin untuk penyimpanan dan pendistribusian vaksin PMK di lapangan, dimana sebagian besar vaksinator telah mendapatkan pelatihan, vaksinator menggunakan *cool/box* dan perlengkapannya dalam melaksanakan vaksinasi, lemari pendingin sudah dilengkapi dengan termometer/termostat, dan adanya pencatatan suhu didalam lemari pendingin secara rutin. Selain program vaksinasi PMK, penerapan biosekuritas di peternakan, mengatur lalu lintas ternak, pengobatan, surveilans, dan pengujian merupakan parameter keberhasilan dalam mengendalikan PMK dan membantu Indonesia Bebas PMK Tahun 2035.

Kata kunci: penyakit mulut dan kuku (PMK), vaksinasi, rantai dingin

ABSTRACT

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease of animals, generally infecting even hoofed animals, including cattle, buffalo, camels, sheep, goats, deer and pigs. This disease has re-emerged in Indonesia and was first identified in the area around the northern and western outskirts of Surabaya, East Java Province in April 2022. The post-vaccination monitoring and evaluation program for foot and mouth disease (FMD) aims to ensure the effectiveness of individual vaccination and develop herd immunity against the FMD virus and ensure that the FMD virus circulating in Indonesia matches the strain/serotype of the virus used to produce the FMD vaccine, namely serotype O. FMD post-vaccination serum was obtained from 24 provinces affected FMD, covering 66 sampling locations with a minimum of 73 samples for each location. The total samples obtained were 5,119 samples (110.80%) from a target of 5,160 samples. The results of serological testing using the SP ELISA method (structural protein) on the serum obtained showed that on average 97.20% of target animals (cows) vaccinated exhibited antibody response to the FMD virus (positive) against FMD virus, 2.21% of serum did not develop antibodies (negative) and 0.59% of serum resulted doubt from 66 sampling locations. In fact, there were 19 out of 66 regencies/cities (28.80%) whose serum showed 100% antibody development against FMD virus. For the cold chain implementation, in general technical implementation units (UPT) which in charge of livestock and animal health division have implemented a cold chain for storing and distributing FMD vaccines in the field, where most of the vaccinators have received training, vaccinators use cool boxes and equipment in carrying out vaccinations, refrigerators or cool rooms are equipped with a thermometer/thermostat and there is a record of temperature in the refrigerator on a regular basis. In addition to the FMD vaccination program, implementing biosecurity on farms, managing livestock traffic, treatment, surveillance, and testing are parameters contributed for success in controlling FMD and helping Indonesia be FMD-free by 2035.

Keywords: foot and mouth disease (FMD), vaccination, cold chain

A. Pendahuluan

1. Latar Belakang

Penyakit mulut dan kuku (PMK) adalah penyakit virus yang sangat menular pada hewan, umumnya menjangkiti hewan berkuku belah/genap, termasuk sapi, kerbau, unta, domba, kambing, rusa, dan babi. Penyakit ini ditemukan di banyak belahan dunia, dan telah dilaporkan di negara-negara di Afrika, Timur Tengah, Asia dan Amerika Selatan (FAO 2012 dan OIE 2022). Virus PMK termasuk dalam genus *Aphthovirus* dari famili *Picornaviridae*, merupakan virus RNA untai tunggal tanpa amplop, terdiri dari tujuh serotipe yaitu: A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2, dan SAT3 (Syed M Jamal & Graham J Belsham, 2013). Virus ini menyebar dengan cepat antar hewan dan diekskresikan dalam napas, air liur, lendir, susu dan feses. Virus dapat dikeluarkan oleh hewan hingga empat hari sebelum gejala klinis muncul. Hewan dapat terinfeksi melalui inhalasi, konsumsi, dan kontak langsung.

Selain berdampak pada kesehatan hewan, kerugian paling signifikan dari penyakit ini adalah kerugian ekonomi, dengan menurunnya produktifitas peternakan, mengakibatkan terganggunya perdagangan ternak dan produknya baik regional maupun internasional, sehingga menyebabkan terbatasnya suplai dan konsumsi pangan dunia (Morgan dan Prakash 2006; OIE 2022, FAO 2012; Knight-Jones and Rushton 2013). Sebagai contoh wabah PMK di Inggris pada tahun 2001 berdampak pada kerugian ekonomi negara tersebut sekitar £7 miliar (Thompson et al. 2002). Dengan alasan ini, badan kesehatan dunia (*World Health Organization/WHO*), menempatkan PMK didalam daftar A penyakit hewan, karena membatasi negara-negara terdampak PMK mengakses pasar ekspor pangan internasional (Leforban 1999).

PMK pertama kali terjadi di Indonesia

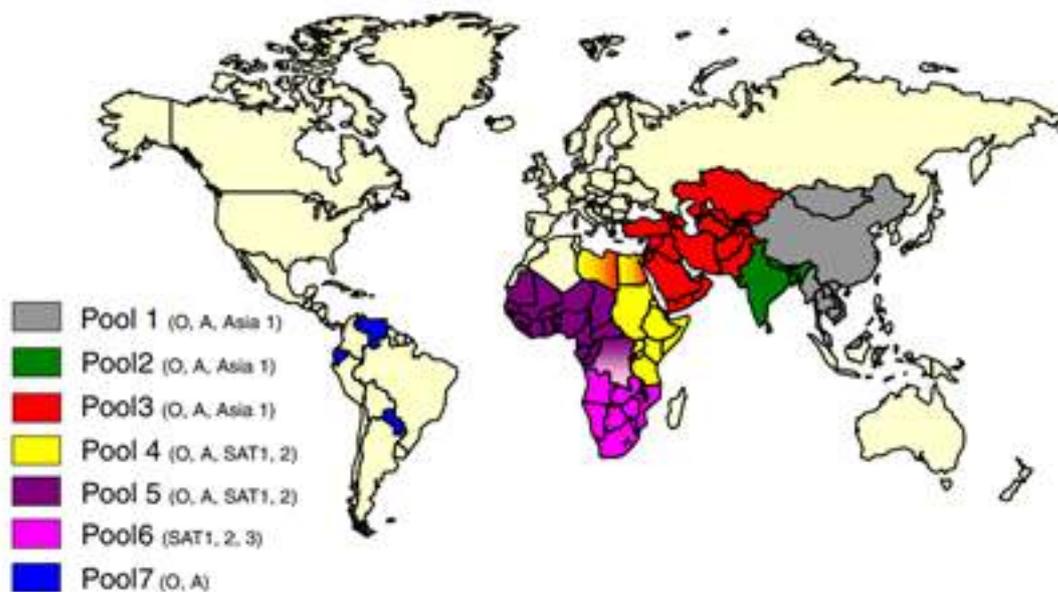
(Malang) pada tahun 1887 lewat impor sapi perah dari Belanda, yang kemudian menyebar ke berbagai wilayah di Indonesia, seperti pulau Jawa, Bali, Nusa Tenggara Timur, Sumatera, Sulawesi, dan Kalimantan (Adjid, A.RM., 2020). Wabah PMK terakhir ada di Pulau Jawa pada tahun 1983 dan pemberantasannya melalui program vaksinasi massal. Indonesia dinyatakan bebas PMK pada tahun 1986 dengan diterbitkannya Surat Keputusan Menteri Pertanian No.260/Kpts/TN.510/5/1986. Selanjutnya pada tahun 1990, Organisasi Kesehatan Hewan Dunia (*World Organization for Animal Health/WOAH*) atau dulunya bernama OIE memberikan pengakuan status bebas PMK di Indonesia sebagaimana yang tercantum dalam resolusi OIE nomor XI tahun 1990 (Widhi Luthfi, 2020). Pada tahun 2013 pemerintah Indonesia menetapkan bahwa PMK merupakan penyakit hewan menular strategis (PHMS) yang harus diwaspadai dan dicegah. Selanjutnya Indonesia masih dinyatakan bebas PMK dan tanpa program vaksinasi yang diputuskan dengan Resolusi OIE nomor XV tahun 2019 (OIE 2019). Namun di tahun 2022 Kementerian Pertanian RI telah melaporkan wabah PMK serotipe O di dua provinsi di pulau Sumatera dan Jawa. Wabah PMK terakhir yang dilaporkan di Indonesia pada tahun 1983 (OIE, 2022).

Dugaan wabah PMK pertama terjadi pada sapi di daerah yang terletak di utara dan pinggiran barat Surabaya Provinsi Jawa Timur, dan penyakit dilaporkan pada 28 April 2022. Selanjutnya kasus PMK dilaporkan pada 1 Mei dan 3 Mei 2022 (OIE, 2022). Kasus klinis awal didiagnosis sebagai demam *bovine ephemeral*, dimana penyakit tidak berhasil diobati serta terjadinya kematian. Dari hasil pengamatan klinis diduga sapi tersebut terinfeksi virus PMK. OIE memprediksi bahwa virus PMK telah menyebar pada sapi di Jawa sejak pertengahan

April (OIE, 2022). Diagnosis dilaporkan ke OIE pada 9 Mei 2022, kemudian sampel swab virus PMK dikirim ke The Pirbright Institute di Inggris yang merupakan laboratorium referensi dunia OIE dan FAO untuk PMK untuk dilakukan karakterisasi virus. Hasil laboratorium mengkonfirmasi virus PMK dengan serotipe O (garis keturunan O/ME-SA/Ind-2001e).

Berdasarkan amanat Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 jo. Undang-Undang Nomor 41 Tahun 2014 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan, setiap obat hewan yang beredar di Indonesia harus memiliki nomor registrasi melalui proses pendaftaran, pengujian dan sertifikasi. Balai Besar Pengujian

Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) merupakan Unit Pelaksana Teknis (UPT) Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan yang mempunyai tugas pokok dan fungsi (tupoksi) sebagai laboratorium yang melaksanakan pengujian mutu dan keamanan obat hewan dalam rangka registrasi dan sertifikasi. Monitoring dan evaluasi serum pascavaksinasi PMK merupakan salah satu parameter untuk uji vaksin (uji potensi) untuk menjamin bahwa vaksin PMK memberikan kekebalan terhadap hewan target yang divaksin. Pengujian terhadap serum tersebut diperlukan untuk memastikan efektivitas dari vaksinasi individu dan membentuk kekebalan kelompok terhadap virus PMK



Gambar 1. Distribusi secara geografis dari 7 Pool virus penyakit PMK di dunia (Syed M. Jamal & Graham J Belsham, 2013)

2. Maksud, Tujuan, dan Manfaat

a. Maksud

Untuk melaksanakan kegiatan monitoring dan evaluasi efektivitas pascavaksinasi PMK tahun anggaran 2022 di 24 provinsi tertular/terdampak pada sapi perah/potong usia minimal 6 (enam) bulan yang telah divaksinasi PMK kedua (*full dose*).

b. Tujuan

Tujuan kegiatan monitoring dan evaluasi efektivitas pascavaksinasi penyakit mulut dan kuku (PMK) tahun anggaran 2022 adalah sebagai berikut:

- Terkumpulnya data dan informasi terkait monitoring dan evaluasi efektivitas program vaksinasi PMK di provinsi/kabupaten/kota;

- Terkumpulnya data rantai dingin vaksin PMK di provinsi/kabupaten/kota yang telah melaksanakan vaksinasi;

c. Manfaat

Manfaat yang diperoleh dari kegiatan monitoring dan evaluasi efektivitas pascavaksinasi PMK tahun anggaran 2022 adalah sebagai berikut:

- Terjaminnya mutu vaksin PMK yang beredar di 24 provinsi tertular/terdampak;
- Diperolehnya kekebalan penyakit PMK pada hewan target (sapi);
- Terkendalinya penyebaran penyakit PMK pada daerah bebas PMK di Indonesia
- Perbaikan dan pemulihan ekonomi dengan dibukanya kembali lalu lintas,

perdagangan dan pengiriman hewan ternak sapi antar wilayah di Indonesia.

- Mempercepat Indonesia mendapatkan kembali status bebas PMK dari OIE (*World Organization for Animal Health*).

B. Materi dan Metode

1. Materi

Bahan yang diperlukan untuk pengambilan serum pascavaksinasi dilaksanakan pada masing-masing lokasi adalah sebagai berikut:

Bahan dan alat yang digunakan untuk pengujian serum pascavaksinasi dan karakterisasi virus PMK, yaitu:

- Kit ELISA SP (*Structural Protein*) dan NSP (*Non-Structural Protein*)
- *Biological Safety Cabinet* (BSC) IIA2
- ELISA reader

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Tabung Venoject	100 buah
2	Jarum Venoject (<i>Vacutainer needle</i>)	100 buah
3	<i>Holder</i>	2 buah
4	<i>Cryotube</i> steril	100 buah
5	Kapas	1 bungkus
6	Alkohol 70%	1 botol
7	Botol <i>spray</i>	1 buah
8	Disinfektan	1 bungkus
9	Plastik <i>biohazard</i>	2 lembar
10	Plastik tahan panas 2 kg	10 lembar
11	Plastik tahan panas 5 kg	10 lembar
12	Baju Hazmat	3 buah
13	Spidol <i>permanent</i> OPF	1 buah
14	<i>Glove nitrile powder free</i> Ukuran L	10 pasang
15	<i>Glove nitrile powder free</i> Ukuran M	10 pasang
16	<i>Glove nitrile powder free</i> Ukuran S	10 pasang
17	Masker	10 buah
18	<i>Cryobox</i>	1 buah
19	Parafilm	secukupnya
20	Pipet <i>Pasteur</i> steril 3 mL	100 buah

2. Metode

a. Pemilihan Metode/Desain Sampling

Metode dan desain sampling kegiatan pengambilan sampel serum berdasarkan Petunjuk Teknis Monitoring dan Evaluasi Pasca Program Vaksinasi PMK sesuai Surat Edaran Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Nomor: 9677/SE/PK.310/F/09/2022. Metode yang digunakan adalah *Multistage Random Cluster Sampling* dengan tahapan *Probability Proportional to Size (PPS)*, yaitu pemilihan secara acak dengan probabilitas pemilihan dari masing-masing unit disesuaikan dengan jumlah populasi ternak dalam unit tersebut, antara lain *sample size* terkecil dimana tiap desa sampling dipilih 73 ekor sapi secara acak sederhana.

b. Target Sampel

- Target lokasi adalah dinas provinsi/kab/kota yang melaksanakan fungsi bidang peternakan dan kesehatan hewan kabupaten/kota, UPT Perbibitan, UPTD Lab provinsi/kab/kota, BBVet/BVet dari 24 provinsi tertular di Indonesia yang sudah melaksanakan vaksinasi PMK kedua yang meliputi Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Nusa Tenggara Barat, Jawa Barat, Lampung, Sumatera Selatan, Riau, Kalimantan Selatan, Sumatera Utara, Jambi, Aceh, Sumatera Barat, Sulawesi Selatan, Kalimantan Barat, Bengkulu, Kalimantan Tengah, DI Yogyakarta, Bangka Belitung, Kalimantan Timur, Banten, DKI Jakarta, Kepulauan Riau dan Sulawesi Barat.
- Target hewan adalah sapi potong/perah umur minimal 6 bulan dan sudah mendapatkan vaksinasi dosis kedua (*full dose*).
- Ternak sapi potong/perah yang diambil sampel serum adalah milik masyarakat atau UPTD perbibitan daerah/pusat.
- Sampel darah diambil 1 – 3 bulan pascavaksinasi kedua
- Volume sampel serum yang dibutuhkan minimal 2 mL per tube.
- Sampel serum untuk uji ELISA disimpan di dalam kulkas/lemari pendingin (2-8 °C) sebelum diambil oleh petugas dari BBPMSOH maksimal 1 minggu setelah pemisahan serum
- Data perolehan sampel serum diinput ke ISIKHNAS dengan nomor BAST monitoring pascavaksinasi PMK oleh petugas pengambil sampel.

c. Tahapan Kegiatan

- Koordinasi dengan dinas provinsi/kabupaten/kota yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan, UPT Perbibitan, UPTD Lab provinsi/kabupaten/kota, BBVet/BVet dari 24 provinsi tertular PMK mengenai lokasi, jumlah sampel, dan jadwal sampling;
- Pendataan realisasi vaksinasi di 24 provinsi tertular/terdampak PMK yang diperoleh dari website crisis centre PMK;
- Pengambilan sampel atau sampling di 24 provinsi tertular/terdampak PMK;
- Pengujian dan analisis sampel serum PMK dengan metode ELISA SP;
- Pelaporan dan pengiriman hasil uji serum PMK ke masing-masing dinas provinsi/kabupaten/kota yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan kabupaten/kota, UPT Perbibitan, UPTD Lab provinsi/kab/kota, BBVet/BVet dari 24 provinsi tertular PMK.

C. Hasil dan Pembahasan

1. Pengujian Serum Pascavaksinasi PMK

Telah dilakukan pengambilan serum pascavaksinasi PMK di 24 provinsi terdampak

PMK di dinas provinsi/kabupaten/kota yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan, termasuk UPT di bawah Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan (Ditjen PKH) dan Perbibitan,

Target total serum pascavaksinasi PMK berjumlah 5.119 sampel dengan total realisasi sebanyak 5.160 sampel atau realisasinya adalah 110,80%, yang diperoleh dari total 66 kabupaten/kota pada 24 provinsi (Tabel 1). Berdasarkan SE Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Nomor: 9677/SE/ PK.310/F/09/2022 mengenai Petunjuk Teknis Monitoring dan Evaluasi Pasca Program Vaksinasi PMK dengan metode *Multistage Random Cluster Sampling* dan *Probability Proportional to Size* (PPS) diperoleh *sample size* terkecil ada 73 sampel per desa.

Terdapat enam dari 24 provinsi dengan target lebih dari 73 sampel per lokasi, yaitu Provinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Nusa Tenggara Barat, Lampung dan Jawa Barat, masing-masing sejumlah 876, 438, 365, 301, 292, dan 365 sampel. Provinsi-provinsi tersebut dipilih karena memiliki populasi sapi terbanyak di antara provinsi lain di Indonesia demikian juga dengan alokasi vaksin PMK, salah satu contoh adalah Provinsi Jawa Timur yang merupakan sentra sapi di Indonesia, dari provinsi ini diperoleh sampel serum terbanyak dengan jumlah 876 sampel, yang berasal dari 12 Kabupaten/Kota.

Secara keseluruhan sampel serum pascavaksinasi telah memenuhi target yaitu 16 dari 40 lokasi sampling dengan persentase 40% yang melebihi dari 73 sampel serum per desa, baik yang diperoleh dari 24 dinas provinsi/kabupaten/kota yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan, termasuk UPT di bawah Ditjen PKH. Realisasi sampel tertinggi berasal dari UPT Eyaitu sebanyak 98 dari 73 sampel atau sebesar 134,24%.

Sementara hanya ada 1 lokasi atau 2,5% dimana jumlah sampelnya kurang dari target, yaitu hanya 45 sampel serum yang diperoleh dari UPT N(Tabel 1). Hal ini disebabkan karena kurangnya waktu dibandingkan dengan target pengambilan sampel.

Realisasi hasil uji terhadap realisasi sampel serum, diperoleh hasil bahwa 100% serum telah diuji (Tabel 1). Pengujian serum pascavaksinasi PMK dilakukan di Unit Uji Virologi dengan menggunakan metode ELISA SP untuk melihat adanya respon kekebalan yang terbentuk dari vaksinasi PMK. Sebagian besar provinsi/kabupaten/kota dan UPT di bawah Ditjen PKH menggunakan vaksin A untuk melaksanakan vaksinasi PMK pertama dan kedua (*full dose*). Vaksin tersebut merupakan bantuan dari Kementerian Pertanian yang didistribusikan ke 24 provinsi terdampak PMK.

Hasil pengujian serologik dengan metode ELISA SP terhadap serum yang diperoleh di Dinas yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan dan UPT Ditjen PKH menunjukkan bahwa rata-rata 97,20% hewan target (sapi) yang divaksin PMK memberikan respon pembentukan antibodi (positif) terhadap virus PMK dan 2,21% menunjukkan respon negatif atau tidak terbentuk antibodi, dan hasil dubius sebanyak 0,59%. Bahkan ada 19 dari 66 kabupaten/kota (28,80%) yang diperoleh serumnya menunjukkan 100% terbentuknya antibodi terhadap virus PMK. Namun, ada beberapa daerah yang menggunakan vaksin PMK yang berbeda untuk vaksin pertama dan kedua, ini dapat dilihat dari Tabel 2. Ada lima kabupaten di Provinsi Jawa Timur, yaitu Sampang, Magetan, Lamongan, Jombang, dan Bojonegoro, termasuk di Kabupaten/Kota Lombok Barat dan Lombok Tengah, Provinsi Nusa Tenggara Barat, dan Kabupaten/Kota Cilacap di Provinsi Jawa Tengah, yang menggunakan vaksin PMK B, pada vaksinasi

kedua. Jika dilihat dari hasil uji secara serologik dengan metode ELISA SP didapatkan hasil bahwa penggunaan vaksin yang berbeda memberikan respon yang sama pada pembentukan antibodi terhadap virus PMK, dimana uji ELISA menunjukkan hasil positif dengan rerata 97,81% antibodi yang terbentuk dan sebanyak 2,19% tidak terbentuk antibodi. Terbentuknya 100% hasil positif antibodi pada

sapi yang divaksin dengan vaksin PMK A dan vaksin PMK B di lokasi sampling Kabupaten Jombang Provinsi Jawa Timur menunjukkan bahwa penggunaan merek vaksin yang berbeda namun memiliki kandungan serotipe virus yang sama tetap memberikan respon positif terhadap pembentukan antibodi terhadap virus PMK pada ternak sapi.

Tabel 1. Realisasi dan Hasil Uji Sampel Serum Pascavaksinasi PMK

No	Provinsi	*Jumlah Sampel			Hasil Uji ELISA SP		
		T	R	R (%)	+ (%)	- (%)	D (%)
1	Jawa Timur	876	876	100	82,19%-100%	0-17,81%	0-1,37%
2	Jawa Tengah	438	445	104,11	96-98,63	0-2,74	0-1,37
3	Bali	365	365	100	97,26-100	0-2,82	0-
4	Nusa Tenggara Barat	301	301	100	93,33-98,68	1,32-6,67	0
5	Lampung	365	369	100-102,74	95,89-100	0-4,11	0-4,11
6	Jawa Barat	292	295	100-102,74	97,33-100	0-1,37	0-1,33
7	Sumatera Selatan	73	73	100	98,63	0	1,33
8	Riau	73	73	100	91,78	6,85	1,37
9	Kalimantan Selatan	73	73	100	97,26	2,74	0
10	Sumatera Utara	73	78	106,85	87,18	12,82	0
11	Jambi	73	74	101,37	90,54	9,46	0
12	Aceh	73	73	100	93,15	6,85	0
13	Sumatera Barat	73	73	100	98,63	1,37%	0
14	Sulawesi Selatan	73	75	102,74	98,67	1,33	0
15	Kalimantan Barat	73	80	109,60	85	12,5	2,5
16	Bengkulu	73	73	100	97,26	2,74	0
17	Kalimantan Tengah	73	75	102,74	98,67	1,33	0
18	DI Yogyakarta	73	73	100	98,63	1,37%	0
19	Bangka Belitung	73	73	100	98,63	0	1,37%
20	Kalimantan Timur	73	74	101,37	94,60	1,35	4,05
21	Banten	73	73	101,37	94,52	4,11	1,37
22	DKI Jakarta	73	73	101,37	100	0	0
23	Kepulauan Riau	73	73	101,37	97,26	2,74	0

No	Provinsi	*Jumlah Sampel			Hasil Uji ELISA SP		
		T	R	R (%)	+ (%)	- (%)	D (%)
23	Kepulauan Riau	73	73	101,37	97,26	2,74	0
24	Sulawesi Barat	73	73	101,37	97,26	0	2,74
25	UPT A	73	79	108,22	98,73	1,27	0
26	UPT B	73	73	100	100	0	0
27	UPT C	73	75	102,74	100	0	0
28	UPT D	73	75	102,74	100	0	0
29	UPT E	73	98	134,25	96,94	2,04	1,02
30	UPT F	73	73	100	100	0	0
31	UPT G	73	73	100	94,52	4,11	1,37
32	UPT H	73	73	100	98,63	0	1,37
33	UPT I	73	73	100	98,63	1,37	0
34	UPT J	73	73	100	100	0	0
35	UPT K	73	73	100	93,15	6,85	0
36	UPT L	73	75	102,74	100	0	0
37	UPT M	73	80	109,60	100	0	0
38	UPT N	73	45	61,64	97,77	2,23%	0
39	UPT O	73	75	102,74	100	0	0
Total		5.046	5.093	100,93%	97,20%	2,21%	0,59%

*Keterangan: T (Target), R (Realisasi), + (hasil uji positif), - (hasil uji negatif), D (hasil uji dubius)

Tabel 2. Aplikasi Vaksin yang berbeda untuk Vaksinasi pertama dan kedua

No.	Provinsi	Kab/Kota	Vaksinasi I	Vaksinasi II	Hasil Uji ELISA SP	
					Positif	Negatif
1		Sampang	A	B	98,63%	1,73 %
2		Magetan	A	B	97,26%	2,74%
3	Jawa Timur	Lamongan	A	B	98,63%	1,37%
4		Jombang	A	B	100%	0%
5		Bojonegoro	A	B	98,63%	1,37%
6		L o m b o k Barat	A	B	98,67%	1,33
7	Nusa Tenggara Barat	L o m b o k Tengah	A	B	93,33%	6,67%
8		Jawa Tengah	Cilacap	A	B	97,33%
Rata-rata					97,81%	2,19%

2. Monitoring dan Evaluasi Pelaksanaan Rantai Dingin

Dalam monitoring dan evaluasi pelaksanaan rantai dingin baik dalam penyimpanan dan distribusi vaksin PMK di lapangan, petugas BBPMSOH dibekali dengan formulir kuisisioner yang diisi secara manual maupun disiapkan secara digital pada *Google Form* yang dikirimkan ke semua *stakeholder* terkait (Tabel 3). Kuisisioner pelaksanaan rantai dingin terdiri dari 19 pertanyaan dengan jawaban ya atau tidak. Dari semua *stakeholder* yang menerima kuisisioner hanya ada 36 UPT/ responden yang mengembalikan atau mengisi melalui tautan *Google form*.

Terdapat 36 responden yang menjawab 19 pertanyaan dalam kuisisioner (Tabel 4). Evaluasi pelaksanaan rantai dingin menunjukkan bahwa 96,31% responden menerima vaksin PMK dalam kondisi baik, terdapat brosur pada kemasan dan cara penggunaannya. Selain itu vaksin disimpan di ruangan yang memiliki ventilasi dan penerangan yang memadai. Sebanyak 85,5% responden memiliki *standard operating procedure* (SOP) untuk penerimaan, penyimpanan dan transportasi vaksin PMK, serta petugas di UPT mengukur suhu saat menerima vaksin PMK yang datang.

Hampir seluruh responden atau sebanyak 97,2% menyatakan bahwa vaksinator telah

mendapatkan pelatihan dan sosialisasi terkait rantai dingin serta menggunakan *coolbox* saat melakukan vaksinasi PMK di lapangan. Namun, hanya sekitar 60-70% UPT memiliki AC di ruangan penyimpanan vaksin, memiliki lemari es yang dilengkapi dengan termometer serta melakukan pencatatan suhu secara rutin. Lebih lanjut, sebagian besar responden (>85%) memberikan keterangan bahwa kondisi penyimpanan di dalam lemari pendingin tidak terlalu penuh, dimana kurang dari 70% dari total kapasitas lemari es.

Sebagian besar responden (>80%) menyatakan bahwa vaksin yang digunakan dalam satu vial habis dalam satu hari atau tidak ada yang tersisa di dalam vial. Jika masih ada yang tersisa maka vaksin akan disimpan di dalam lemari untuk dipergunakan dihari berikutnya. Lebih dari setengah petugas UPT (60%) menggunakan jarum yang sama pada saat mengambil vaksin di dalam vial/botol. Ini sebaiknya dihindari untuk mencegah terjadinya kontaminasi di dalam produk vaksin. Namun, hampir seluruh atau lebih dari 97% dari petugas UPT menggunakan jarum yang berbeda pada saat melaksanakan vaksinasi PMK di lapangan. Ini tentunya cara yang paling tepat dan aman untuk mencegah terjadi kontaminasi dan infeksi silang antara hewan ternak yang divaksin.

Tabel 3. Pengumpulan Kuisisioner Monitoring dan Evaluasi Pelaksanaan Rantai Dingin dari 36 Lokasi

Kode Lokasi	Provinsi	Nama Dinas Prov/Kab/Kota/UPT	Lokasi Sampling
1	Sumatera Selatan	BPTU HPT Sembawa	Banyuasin
2	Sulawesi Barat		Mamasa
3	Sulawesi Barat	Dinas Tanaman Pangan Hortikultura dan Peternakan Sulawesi Barat	Majene
4	Sulawesi Barat	Dinas Tanaman Pangan, Hortikultura dan Peternakan	Mamuju Tengah
5	Lampung	Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Lampung	Way Kanan

Kode Lokasi	Provinsi	Nama Dinas Prov/Kab/Kota/UPT	Lokasi Sampling
6	Sulawesi Barat	Dinas Tanaman Pangan Hortikultura dan Peternakan Provinsi Sulawesi Barat	Mamuju
7	DI Yogyakarta		Mandar
8	Lampung	Dinas Pertanian dan Ketahanan Pangan	Sleman
9	Lampung	Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan	Tulang Bawang Barat
10	Sumatera Utara	Upt Puskesmas Wilayah Langkat Hulu	Langkat
11	Bali	Dinas Pertanian dan Ketahanan Pangan	Gianyar
12	Bali	Dinas Pertanian dan Ketahanan Pangan	Badung
13	Lampung	Dinas Perikanan dan Peternakan Kabupaten Lampung Timur	Lampung timur
14	Jawa Timur	UPT Pembibitan Ternak dan Kesehatan Hewan Madura - Dinas Peternakan Provinsi Jawa Timur	Pamekasan
15	Jawa Timur	UPT Pembibitan Ternak dan Kesehatan Hewan Madura	Bangkalan
16	Kalimantan Tengah	Dinas Pertanian, Hortikultura dan Peternakan	Palangka Raya
17	Kepulauan Riau	Dinas Ketahanan Pangan Pertanian dan Kesehatan Hewan Provinsi Kepulauan Riau	Tanjungpinang
18	Jawa Barat	Dinas Perikanan dan Peternakan Kabupatrn Bandung Barat	Kabupaten Bandung Barat
19	Aceh	Dinas peternakan aceh	Aceh barat daya
20	DKI Jakarta	Ketahanan Pangan, Kelautan dan Pertanian	Jakarta
21	Lampung	Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan	Lampung Selatan
22	Nusa Tenggara Barat	Dinas Pertanian Kab. Lombok Barat	Lombok Barat
23	Lampung	Dinas Pertanian	Tulang Bawang
24	Sumatera Barat	Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan	Dharmasraya
25	Lampung	Dinas Pertanian kabupaten Lampung Utara	Lampung Utara
26	Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan	Provinsi Sumatera Utara	Kabupaten Langkat
27	Jawa Barat	Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan	Kuningan
28	Jawa Barat	Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan	Subang
29	Jawa Barat	BIB Lembang	Bandung Barat
30	Sulawesi Selatan	Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Kab. Bone	Bone
31	Bali	Dinas Pertanian Ketahanan Pangan dan Perikanan Kab Bangli	Bangli/Bangli
32	Bengkulu	Dinas Pertanian Kab Mukomuko	Mukomuko

Kode Lokasi	Provinsi	Nama Dinas Prov/Kab/Kota/UPT	Lokasi Sampling
33	Bengkulu	Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Bengkulu	Mukomuko
34	Jawa Timur	UPT Pembibitan Ternak Dan Kesehatan Hewan	Pamekasan
35	Kalimantan Selatan	BVet Banjarbaru	Banjarbaru
36	Kalimantan Selatan	Dinas Perkebunan & Peternakan	Banjarbaru

Tabel 4. Resume Jawaban Responden terkait Pelaksanaan Rantai Dingin Vaksin PMK

No.	Pertanyaan	Jawaban Responden*	
		Ya	Tidak
1	Apakah vaksin diterima dalam kondisi baik & utuh?	36	0
2	Apakah vaksin diterima disertai dengan brosur?	33	3
3	Apakah vaksin diterima disertai dengan cara penggunaannya?	35	1
4	Apakah Dinas provinsi/kab/kota mempunyai prosedur penerimaan, penyimpanan, transportasi vaksin PMK ke kab/kota, pemusnahan vaksin sisa vaksinasi (botol, alat suntik, APD dll)?	30	6
5	Apakah Dinas provinsi/kab/kota memeriksa suhu <i>cold box</i> transportasi tempat penyimpanan vaksin ketika vaksin? Jika ya,? Berapa suhunya? apakah suhunya memenuhi syarat 2-8 °C?	32	4
6	Apakah ventilasi dan penerangan di ruangan penyimpanan vaksin memadai ?	36	0
7	Apakah ada pengatur suhu (AC) di ruang penyimpanan vaksin?	25	11
8	Apakah vaksin yang disimpan terdapat kerusakan pada kemasan?	0	36
9	Apakah tempat penyimpanan vaksin (<i>cool room/refrigerator</i>) dilengkapi dengan termometer?	25	11
10	Apakah ada pencatatan/pengecekan rutin suhu pada tempat penyimpanan (<i>cool room/refrigerator</i>) vaksin ?	21	15
11	Apakah kondisi tempat penyimpanan (<i>cool room/refrigerator</i>) vaksin padat/terlalu penuh (isi lebih 70% total kapasitas)?	5	31
12	Apakah petugas yang menangani penyimpanan vaksin mendapatkan sosialisasi terkait rantai dingin?	34	2
13	Apakah pernah terjadi mati lampu? Jika jawaban Ya, berapa lama?	11	25
14	Apakah dinas provinsi/kab/kota mempunyai Genset?	12	24
15	Apakah vaksinator sudah mendapatkan pelatihan penanganan rantai dingin vaksin?	35	1
16	Apakah vaksinator ketika membawa vaksin di lapangan menggunakan <i>cool box</i> ?	36	0
17	Apakah vaksin dalam botol/vial digunakan habis dalam 1 hari. Jika TIDAK bagaimana perlakuannya	29	7
18	Apakah penyedotan vaksin dari botol/vial menggunakan jarum yang tetap	22	14
19	Apakah penyuntikan vaksin ke ternak menggunakan jarum yang berbeda	35	1

Tabel 5. Jawaban Responden terkait Pelaksanaan Rantai Dingin Vaksin PMK Berdasarkan Kode Lokasi

Pertanyaan	Kode Dinas/IUPT/Lokasi																												Jumlah											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	Y	T		
Apakah vaksin diterima dalam kondisi baik & utuh?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	36	0	
Apakah vaksin diterima disertai dengan brosur?	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	33	3
Apakah vaksin diterima disertai dengan cara penggunaannya?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	35	1
Apakah Dinas provinsi/kab/kota mempunyai prosedur penerimaan, penyimpanan, transportasi vaksin PMK ke kab/kota, pemusnahan vaksin sisa vaksinasi (botol, alat suntik, APD dll)?	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	30	6
Apakah Dinas provinsi/kab/kota memeriksa suhu cold box transportasi tempat penyimpanan vaksin ketika vaksin? Jika ya? Berapa suhunya? apakah suhunya memenuhi syarat 2-8 oC?	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	32	4
Apakah ventilasi dan penerangan di ruangan penyimpanan vaksin memadai?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	36	0
Apakah ada pengatur suhu (AC) di ruang penyimpanan vaksin?	Y	Y	T	Y	Y	T	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	T	Y	T	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	25	11
Apakah vaksin yang disimpan terdapat kerusakan pada kemasan?	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	0	36

Tabel 5. Jawaban Responden terkait Pelaksanaan Rantai Dingin Vaksin PMK Berdasarkan Kode Lokasi (lanjutan)

Pertanyaan	Kode Dinas/UPT/Lokasi																														Jumlah																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	Y	T									
Apakah tempat penyimpanan vaksin (<i>cool room/refrigerator</i>) dilengkapi dengan termometer?	Y	Y	T	Y	Y	Y	T	Y	Y	T	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	T	25	11						
Apakah ada pencatatan/ pengecekan rutin suhu pada tempat penyimpanan (<i>cool room/refrigerator</i>) vaksin ?	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	T	21	15			
Apakah kondisi tempat penyimpanan (<i>cool room/refrigerator</i>) vaksin padat/terlalu penuh (isi lebih 70% total kapasitas)?	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	5	31			
Apakah petugas yang menangani penyimpanan vaksin mendapatkan sosialisasi terkait rantai dingin?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	34	2	
Apakah pernah terjadi mati lampu? Jika jawaban Ya, berapa lama?	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	11	25	
Apakah dinas provinsi/kab/kota mempunyai Genset?	Y	T	T	T	Y	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	12	24	
Apakah vaksinator sudah mendapatkan pelatihan penanganan rantai dingin vaksin?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	35	1	
Apakah vaksinator ketika membawa vaksin di lapangan menggunakan <i>cool box</i> ?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	36	0	
Apakah vaksin dalam botol/vial digunakan habis dalam 1 hari. Jika TIDAK bagaimana perlakuannya	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	29	7
Apakah penyedotan vaksin dari botol/vial menggunakan jarum yang tetap	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	22	14
Apakah penyuntikan vaksin ke tempat menggunakan jarum yang berbeda	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	35	1

D. Kesimpulan dan Saran/Tindak Lanjut

1. Kesimpulan

Dari hasil kegiatan monitoring dan evaluasi efektivitas pascavaksinasi penyakit mulut dan kuku (PMK) tahun anggaran 2022, dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Serum pascavaksinasi PMK yang diperoleh BBPMSOH melebihi target yaitu sebanyak 5.160 atau 110,80% dari target yaitu 5.119 sampel. Lebih lanjut ada enam dari 24 provinsi dengan target lebih dari 73 sampel per lokasi, yaitu Provinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Nusa Tenggara Barat, Lampung dan Jawa Barat.
- Hasil pengujian serologik dengan metode ELISA SP terhadap serum yang diperoleh di Dinas yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan dan UPT Ditjen PKH menunjukkan rata-rata 97,20% hewan target (sapi) yang divaksin PMK memberikan respon pembentukan antibodi (positif) terhadap virus PMK, sebanyak 2,21% tidak terbentuk antibodi (negatif), dan dubius sebesar 0,59% dari 66 lokasi sampling. Bahkan ada 19 dari 66 kabupaten/kota (28,80%) yang diperoleh serumnya menunjukkan 100% terbentuknya antibodi terhadap virus PMK.
- Terhadap daerah yang menggunakan vaksin PMK yang berbeda untuk vaksinasi pertama dan kedua diperoleh hasil bahwa penggunaan merek vaksin PMK yang berbeda memberikan respon yang sama pada pembentukan antibodi terhadap virus PMK, dimana uji ELISA menunjukkan rerata- 97,81% hasil positif antibodi yang terbentuk dan sebanyak 2,19% tidak terbentuk antibodi. Terbentuknya 100% hasil positif antibodi pada sapi yang divaksin dengan vaksin PMK A dan vaksin PMK B di lokasi sampling Kabupaten Jombang Provinsi Jawa Timur

- Secara keseluruhan UPT telah menerapkan rantai dingin untuk penyimpanan dan pendistribusian vaksin PMK di lapangan, dimana sebagian besar vaksinator telah mendapatkan pelatihan, vaksinator menggunakan *cool/box* dan perlengkapannya dalam melaksanakan vaksinasi, lemari pendingin sudah dilengkapi dengan termometer/termostat dan adanya pencatatan suhu didalam lemari pendingin secara rutin.

2. Saran/Tindak Lanjut/Rekomendasi

Ada beberapa saran yang perlu ditindaklanjuti terkait kegiatan monitoring dan evaluasi efektivitas pascavaksinasi penyakit mulut dan kuku (PMK), antara lain:

- UPT perlu membuat target vaksinasi harian sehingga dapat mempercepat kegiatan vaksinasi.
- Adanya petugas yang ditunjuk khusus untuk melaksanakan input data ke ISIKHNAS.
- Petugas sebaiknya mengikuti prosedur atau SOP yang telah dibuat untuk kelancaran dan efektivitas kegiatan vaksinasi.
- Perlunya tambahan personil dengan melibatkan perangkat desa, karang taruna, mahasiswa, dan aparat desa lainnya untuk kegiatan pendataan, vaksinasi, penandaan, pengobatan, penanganan ternak, mobilisasi kegiatan, penunjukkan lokasi sampling dan sebagainya untuk akselerasi kegiatan vaksinasi.
- Perlu tersedianya genset di setiap UPT yang memiliki ruangan dingin (*cool room*) untuk penyimpanan vaksin untuk memastikan mutu vaksin tetap terjaga selama insiden mati lampu/listrik PLN.
- Selain program vaksinasi PMK, penerapan biosekuritas di peternakan, mengatur lalu lintas ternak, pengobatan, surveilans, dan pengujian merupakan parameter keberhasilan dalam mengendalikan PMK di Indonesia.

- Perlunya penerapan rantai dingin untuk penanganan vaksin baik di dinas maupun di lapangan untuk menjamin mutu vaksin PMK, mendukung keberhasilan program vaksinasi PMK dan membantu Indonesia Bebas PMK Tahun 2035.
- Perlunya pengujian lanjutan ELISA *Non-structural Protein* (NSP) dan *Virus Neutralization Test* (VNT) untuk mengetahui efektivitas vaksin lebih dalam.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ingin mengucapkan terima kasih banyak kepada 24 Dinas provinsi/kabupaten/kota yang membidangi fungsi peternakan dan Kesehatan hewan, UPT Direktorat Peternakan dan Kesehatan Hewan (B/BVet dan BPTU-HPT), Kepala BBPMSOH beserta tim internal, serta berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu terlaksanakan kegiatan Monitoring dan Evaluasi Pascavaksinasi PMK.

Daftar Pustaka

Adjid, A.R.M., 2020. Penyakit Mulut dan Kuku: Penyakit Hewan Eksotik yang Harus Diwaspadai Masuknya ke Indonesia. *WARTAZOA* Vol. 30 No. 2 Th. 2020 Hlm. 61-70. <https://medpub.litbang.pertanian.go.id>

- FAO 2003 Biosecurity in food and agriculture. Report on the 17th Session of the committee on agriculture, Rome 31 March–4 April 2003. See <http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/006/Y8453E.HTM>.
<https://crisiscenterpmk.ditjenpkh.pertanian.go.id/>
- Leforban, Y., 1999. Prevention measures against foot-and-mouth disease in Europe in recent years. *Vaccine*, 17(13-14), pp.1755-1759.
- Jamal, S.M. and Belsham, G.J., 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Veterinary research*, 44(1), pp.1-14.
- Morgan, N. and Prakash, A., 2006. International livestock markets and the impact of animal disease. *Rev Sci Tech*, 25(2), pp.517-528.
- OIE (2022) WAHIS (World Animal Health Information System) report 53545. Available from: <https://wahis.oie.int/#/report-info?reportId=53545> (Accessed 17th May 2022)
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., Creigh-Tyte, S. and Brown, C., 2002. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 21(3), pp.675-687.
- Widhi Luthfi, 2020. Success Story Pembebasan Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) di Indonesia. <https://www.goodnewsfromindonesia.id> > IPTEK.

KAJIAN ASPEK KEAMANAN PADA SAMPEL OBAT HEWAN PROBIOTIK YANG MENGANDUNG BAKTERI *ENTEROCOCCUS*

*Ernes Andesfha, Dina Kartini, Febrina H Hariandja, Derra Apriliyani, Sri Arofah, Citra Patrianegari, Sarji

Unit Uji Bakteriologi
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340

*email: ernes.andesfhaa@gmail.com

ABSTRAK

Larangan penggunaan *antibiotic growth promotor* menyebabkan penggunaan probiotik menjadi meningkat. Penggunaan probiotik memiliki beberapa risiko antara lain adanya kontaminasi, kesalahan identifikasi, mikroorganisme pada probiotik menyebabkan infeksi, menghasilkan toksin, resistan antibiotik dan membawa gen resistan. Tujuan kajian ini untuk memperoleh data mutu dan keamanan dari 20 sampel pengkajian probiotik tahun 2022 yang mengandung bakteri *Enterococcus*. Parameter uji meliputi identifikasi probiotik, uji kontaminasi, uji kandungan probiotik, uji sensitifitas terhadap delapan antibiotik, serta uji deteksi gen penyandi resistansi pada isolat yang resistan. Target gen yang dideteksi adalah gen *tetK*, *tetM*, *cfr*, *cat*, *fexA*, *ermDK1*, *ermDK2*, *ereA*, *ermA*, *ermB*, *aac(6')-aph(2)*, *aadB*, *Aph*, dan *erm34*. Hasil uji fisik dan uji kontaminasi menunjukkan semua sampel memenuhi persyaratan. Adapun uji jumlah kandungan menunjukkan hasil terdapat empat sampel yang tidak memenuhi syarat. Uji identifikasi isolat *Enterococcus* dengan 16s DNA sekuensing mampu mendeteksi semua sampel hingga level spesies yaitu *Enterococcus faecium*. Hasil uji sensitifitas antibiotik terhadap 20 isolat *Enterococcus* dengan metode agar dilusi diperoleh semua isolat resistan kloramfenikol dan eritromisin, adapun 12 isolat resistan tetrasiklin. Sebanyak 12 isolat *multidrugresistance* terhadap tiga golongan antibiotik yaitu kloramfenikol, eritromisin dan tetrasiklin. Hasil deteksi gen resistan didapatkan 1 isolat yang resistan kloramfenikol positif memiliki gen resistan *cat* dan 1 isolat resistan eritromisin positif memiliki gen resistan *ermB*. Sedangkan 12 isolat yang resistan tetrasiklin hasilnya semua isolat positif memiliki gen resistan *tetK* dan *tetM*. Gen resistan *tetK*, *tetM*, *cat* dan *ermB* terletak di plasmid memiliki potensi menyebarkan resistansi. Berdasarkan kajian ini disimpulkan bahwa terdapat 12 sampel yang tidak memenuhi uji mutu dan adanya risiko bahaya resistan pada 60% sampel probiotik *Enterococcus* karena menunjukkan resistan terhadap beberapa antibiotik dan memiliki gen resistan yang terletak di plasmid yang berpotensi menyebarkan sifat resistansi.

Kata kunci: probiotik, keamanan, mutu, *Enterococcus*, resistan

ABSTRACT

The ban on the use of antibiotic growth promoters causes the use of probiotics to increase. The use of probiotics has several risks, including contamination, misidentification, microorganisms in probiotics causing infection, producing toxins, antibiotic resistance and carrying resistant genes. The purpose of this study is to obtain quality and safety data from 20 probiotic assessment samples in 2022 containing Enterococcus bacteria. Test parameters include probiotic identification, contamination test, probiotic content test, sensitivity test to eight antibiotics, and detection test of resistance coding genes in resistant isolates. The gene targets detected are tetK, tetM, cfr, cat, fexA, ermDK1, ermDK2, ereA, ermA, ermB, aac(6')-aph(2), aadB, Aph, and erm34 genes. Physical test results and contamination tests show that all samples meet the requirements. The test of the amount of content showed the results of four samples that did not meet the requirements. The identification test of Enterococcus isolates with 16s DNA sequencing is able to detect all samples up to the species level, namely Enterococcus faecium. The results of antibiotic sensitivity tests on 20 isolates of Enterococcus with the method for dilution obtained all isolates of chloramphenicol and erythromycin resistance, as well as 12 isolates of tetracycline resistance. A total of 12 isolates of multidrugresistance to three classes of antibiotics namely chloramphenicol, erythromycin and tetracycline. The results of the detection of resistant genes found that 1 isolate of positive chloramphenicol resistance had a cat resistant gene and 1 positive erythromycin-resistant isolate had an ermB resistant gene. While the 12 tetracycline-resistant isolates resulted in all positive isolates having tetK and tetM resistant genes. The tetK, tetM, cat and ermB resistance genes located in plasmids have the potential of spreading resistance. Based on this study, it was concluded that there were 12 samples that did not meet the quality test and there was a risk of resistance in 60% of Enterococcus probiotic samples because they showed resistance to several antibiotics and had resistant genes located in plasmids that had the potential to spread resistance.

Keywords: antibiotics, safety, quality, probiotics, resistance

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Antibiotik selain digunakan untuk terapi, juga sering digunakan sebagai *Antibiotic Growth Promotor* (AGP), yaitu penggunaan antibiotik di bawah dosis terapi. Hasil uji sensitifitas antibiotik menunjukkan bahwa tingkat resistansi AGP di peternakan ayam sudah sangat tinggi (Bimantara *et al.* 2021). Larangan penggunaan AGP dan hormon untuk penggemukan tertulis dalam Undang-Undang No. 18 tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan yang kemudian diperjelas dengan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 14/Permentan/PK.350/5/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan Antibiotik sebagai AGP. Pemerintah Indonesia efektif melarang penggunaan AGP pada 01 Januari 2018. Pelarangan penggunaan AGP kemudian memacu pengembangan berbagai alternatif pengganti AGP, salah satu alternatifnya adalah probiotik.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) dan *World Health Organization* (WHO) *Working Group* mendefinisikan probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang memadai memberikan manfaat kesehatan bagi (FAO/WHO, 2002). Probiotik untuk hewan yang beredar secara umum memiliki kandungan yang beragam, antara lain produk yang mengandung hanya satu strain (*single strain probiotic*), probiotik multistrain, atau kombinasi antara jamur dan bakteri dalam satu produk. Aplikasi probiotik di peternakan telah lama dilakukan dan berkembang pesat. Hal ini disertai dengan berbagai kajian potensi probiotik, baik sebagai *growth promotor*, atau sebagai pencegahan/pengobatan infeksi bakteri patogen. Namun, kajian mengenai keamanan probiotik belum banyak dilakukan, terutama untuk probiotik yang digunakan di peternakan. Penggunaan

probiotik untuk hewan ternak sangat berbeda dengan penggunaan probiotik untuk manusia. Penggunaan probiotik di hewan ternak dalam waktu yang panjang dan terus menerus, oleh sebab itu, penting dilakukan kajian keamanan probiotik yang digunakan dalam pakan ternak yang beredar di lapangan.

Beberapa kajian keamanan probiotik pada peternakan menjelaskan ada beberapa risiko keamanan dari probiotik, antara lain: 1) Kontaminasi mikroorganisme lain pada sampel probiotik, 2) Identifikasi mikroorganisme yang digunakan sebagai probiotik, murni/sesuai, serta bukan organisme yang berbahaya bagi kesehatan ternak, 3) Mikroorganisme yang digunakan apakah dapat mengakibatkan infeksi atau menghasilkan toksin yang berbahaya, dan 4) Probiotik tidak menyebarkan gen resistan antibiotik (FAO, 2016). Oleh sebab itu, meskipun probiotik dapat digunakan sebagai alternatif pengganti AGP, akan tetapi ada potensi risiko bahaya yang harus dipastikan tidak terjadi pada sediaan-sediaan probiotik yang diijinkan untuk digunakan di hewan ternak. Sehingga produk yang beredar adalah aman bagi hewan dan lingkungan serta manusia.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) memiliki tugas pokok antara lain melaksanakan pengujian mutu obat hewan dan melakukan pengembangan teknik metoda pengujian mutu obat hewan. Unit Uji Bakteriologi-BBPMSOH dalam rangka melaksanakan tupoksi tersebut, melakukan kajian aspek keamanan pada sampel probiotik khususnya yang mengandung *Enterococcus*. *Enterococcus* sangat penting dievaluasi karena sifatnya yang oportunistik dan berhubungan erat dengan infeksi di rumah sakit atau suatu komunitas. Kajian aspek keamanan pada probiotik meliputi uji identifikasi probiotik, uji kontaminasi, uji mutu kandungan probiotik, uji sensitifitas terhadap delapan antibiotik yang

direkomendasikan *The European Food Safety Authority* (EFSA) yaitu ampisilin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol (EFSA, 2016). Selanjutnya uji deteksi gen resistan pada isolat yang resistan. Gen yang ditargetkan adalah gen resistan yang banyak ditemukan di bakteri gram positif: gen *tetK*, *tetM*, *cfr*, *cat*, *fexA*, *ermDK1*, *ermDK2*, *ereA*, *ermA*, *ermB*, *aac(6')-aph(2)*, *aadB*, *Aph*, dan *erm34*.

Kajian ini bertujuan untuk memperoleh data mutu dan keamanan probiotik untuk peternakan yang mengandung bakteri *Enterococcus* yang telah beredar di Indonesia. Hasil kajian ini diharapkan dapat menjadi salah satu sumber data ilmiah untuk pemerintah membuat kebijakan tentang peraturan/ketentuan registrasi produk probiotik dan metode pengujian hingga dapat menyentuk aspek keamanan untuk produk probiotik di bidang kesehatan hewan.

MATERI DAN METODE

Kegiatan pengkajian dilakukan pada bulan April - Oktober 2022, dengan melakukan pengambilan sampel di perusahaan importir probiotik/ produsen/ distributor probiotik. Pengujian dilakukan di Unit Uji Bakteriologi dan Unit Biotek BBPMSOH.

MATERI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada kajian ini adalah produk probiotik, *Buffer Phosphate Water* (BPW) (Oxoid, UK), *Phosphate Saline Solution* (PSS) (Gibco, USA), NaCl fisiologis (Merck, Jerman), *KF Streptococcus Agar* (Difco, USA), *Rappaport Vasiliadis Soy* (RVS) (Difco, USA), *Tetrathionate Broth* (TTB) (Difco, USA), *Xylose Lactose Dextrose* (XLD) (Difco, USA), *Bismuth Sulphite Agar* (BSA) (Sigma Aldrich, USA), *Eosin Methylene Blue* (EMB) (Difco, USA), *Pseudomonas isolation agar*/Cetrimide

Agar (Difco, USA), *Rabbit Plasma Fibrinogen Agar* (Sigma Aldrich, USA), *Muller Hinton Agar* (MHA) (Difco, USA), dan *Heart Infusion Agar* (HIA) (Difco, USA). Bakteri *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Antibiotik ampisilin (Sigma Aldrich, USA), gentamisin (Sigma Aldrich, USA), kanamisin (Sigma Aldrich, Cina), streptomisin (Sigma Aldrich, USA), eritromisin (Sigma Aldrich, Cina), klindamisin (Sigma Aldrich, USA), tetrasiklin (Sigma Aldrich, Cina), kloramfenikol (Sigma Aldrich, USA), *PrepMan™ Ultra* (Applied Biosystems, USA), *RT-PCR Grade Water* (Applied Biosystems, USA), *HotStarTaq® Master Mix Kit* (Qiagen, Germany), primer 16s (3 pasang), primer gen resistan target gen *tetK*, *tetM*, *cfr*, *cat*, *fexA*, *ermDK1*, *ermDK2*, *ereA*, *ermA*, *ermB*, *aac(6')-aph(2)*, *aadB*, *Aph*, *erm34*, *Distilled Water 2* (DW2), *Agarose Gel* (Invitrogen, USA), *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA), *DNA Ladders 100 bp* (Invitrogen, USA), *10X Blue Juice* (Invitrogen, USA), *TAE Buffer 10X* (Invitrogen, USA), Enzim *ExoSAP PCR product Clean up Reagent* (Thermo Fisher Scientific, USA), *BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1* (Applied Biosystems, USA), *BigDye X Terminator Purification kit* (Applied Biosystems, USA), *Polymer POP7* (Applied Biosystems, USA), *Buffer Anoda* (Applied Biosystems, USA), *Buffer Cathoda* (Applied Biosystems, USA).

Alat yang digunakan pada kajian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi, ose 1 ul *disposable*, tube 1,5-2 ml, tabung mikro 200 µl, pipet dan tips 10 µl, 100 µl, 1000 µl, pipet 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, *plate well 96*, *heating block*, inkubator 37°C, inkubator 37°C CO₂, sentifuse, timbangan digital, sampel spreader, vorteks, *mini spin down*, mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang terdiri dari mesin *thermal*

cycler, peralatan elektroforesis, peralatan *gel documentation system* dan mesin DNA *sequencer* ABI 3500 DNA *analyzer* (Applied Biosystems, USA).

Pengambilan sampel probiotik dilakukan di gudang penyimpanan produk di masing-masing distributor/ produsen. Sampel yang diambil memiliki masa kadaluarsa minimal enam bulan dari waktu pengambilan sampel dan kemasan dalam keadaan baik. Setiap produk diambil sampel sebanyak 4 kemasan (baik dalam betsyang sama ataupun berbeda bets) dengan jumlah minimal @200 gram/kemasan. Wadah penyimpanan harus steril dan tertutup rapat sampai dilakukan pengujian di laboratorium. Pada setiap kemasan diberi label yang berisi informasi antara lain; nama sampel, perusahaan, nomor bets, masa kadaluarsa, komposisi, dan tanggal pengambilan sampel. Proses transportasi dan penyimpanan harus memenuhi kondisi penyimpanan yang dipersyaratkan sampel. Pada kajian ini diperoleh 5 jenis produk probiotik dengan total 20 sampel yang berasal dari 5 perusahaan importir dan distributor. Semua sampel probiotik merupakan produk import yang berbentuk serbuk dan mengandung lebih dari satu jenis bakteri dan salah satunya adalah bakteri *Enterococcus*.

METODE

1. Uji Fisik

Uji fisik dilakukan pada setiap sampel probiotik dengan cara menimbang 25 gram produk probiotik dan dilarutkan dengan 225 ml BPW, selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap keseragaman warna, homogenitas, adanya partikel asing. Pengujian fisik dilakukan sebagaimana Uji Umum dalam Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Sediaan Biologik Edisi 5 tahun 2018 Lampiran I.

2. Uji Kontaminasi

Sampel yang telah diencerkan pada uji

fisik selanjutnya diuji kontaminasi terhadap *Salmonella sp*, *E. coli*, *Pseudomonas sp* dan *Staphylococcus sp*. Uji kontaminasi *Salmonella sp*. dilakukan dengan menginokulasikan sampel probiotik sebanyak 0,1 ml untuk diinokulasikan ke media RVS broth 10 ml, dan diambil 1 ml untuk diinokulasikan dalam media TTB 10 ml, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, sampel dikultur di media XLD dan BSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dilihat adakah pertumbuhan bakteri (SNI/ISO 6579:2015). Uji kontaminasi *E. coli* dilakukan dengan menginokulasikan sampel probiotik yang telah diencerkan dengan BPW ke media EMB Agar, pengamatan bakteri dilakukan setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (AOAC, 2002).

Uji kontaminasi *Pseudomonas sp*. dengan cara sampel probiotik yang telah diencerkan dikultur pada media *Pseudomonas isolation agar/ Cetrimide Agar* dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, jika terdapat kontaminasi maka koloni *Pseudomonas sp* akan berwarna hijau pada umur 18 jam dan berwarna biru kehijauan pada umur 24-48 jam setelah inkubasi (AOAC, 2002). Uji kontaminasi *Staphylococcus sp* dilakukan dengan mengkultur 1 ml sampel probiotik pada media *Rabbit Plasma Fibrinogen Agar* pada dua cawan petri. Media agar dituang dengan tinggi 3 mm dan diaduk hingga rata. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati pertumbuhan bakteri (ISO 6888-2:1999).

3. Uji Kandungan Bakteri, Kapang dan Khamir

Preparasi sampel pada semua kemasan produk dilakukan dengan cara menimbang masing-masing sampel sebanyak 25 gram dan ditambahkan 225 ml pelarut BPW dan larutan pengencer PSS. Pengenceran dilakukan secara serial menggunakan PBS, pengenceran

dibuat sesuai dengan jumlah kandungan yang tercantum dalam label dan pengujian dilakukan secara duplo. Media yang digunakan adalah media KF *Streptococcus Agar* untuk bakteri *Enterococcus sp/ Enterococcus faecium* dengan metode agar tuang. Jumlah perbandingan sampel yang telah diencerkan dan media yang digunakan adalah 1:9 dan diinkubasi pada suhu 37°C CO₂ 5% selama 18-24 jam. Setelah masa inkubasi dihitung jumlah kandungan bakteri yang tumbuh dan dibandingkan dengan nilai persyaratan setiap bakteri pada kemasan/ dokumen produk probiotik.

4. Uji Identifikasi Bakteri Probiotik Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dan *Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)* Sekuensing 16s

Uji identifikasi bakteri probiotik dilakukan dengan mengambil koloni yang menunjukkan morfologi koloni menciri sebagai bakteri *Enterococcus* pada media KF agar. Selanjutnya dikultur pada media umum yaitu HIA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diekstraksi menggunakan metode *boiling* dengan mengambil 1 - 2 ose dan dilarutkan dengan 100 µl *Ultra Sample Preparation Reagent (PrepMan®)*, *Applied Biosystems, Foster City, CA*). Sampel dihomogenkan dengan menggunakan vorteks selama 10–30 detik dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, kemudian didinginkan selama 2 menit di suhu ruang, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 2 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 50 µl sebagai *master stock Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)* (De Medici *et al.*, 2003).

Identifikasi spesies *Enterococcus* dilakukan dengan menganalisis urutan nukleotida pada gen 16s, sekuen primer *forward* BSF8/20 (F) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', dan sekuen primer *reverse* BSF517/17 (R)

5'-GCCAGCAGCCGCGGTAA-3') (Cai *et al.*, 2003) dengan panjang amplicon 1540 bp. Amplifikasi menggunakan *HotStarTaq® Master Mix Kit* dengan volume total sebanyak 25 µl yang terdiri dari 12.5 µl *HotStarTaq*, 1 µl primer *forward* (10 µM), 1 µl primer *reverse* (10 µM), 5.5 µl dH₂O dan 5 µl *DNA template*. Proses PCR meliputi siklus pre denaturasi 95°C selama 10 menit, dilanjutkan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit, ekstensi suhu 72°C selama 1 menit, ekstensi akhir suhu 72°C selama 10 menit. Visualisasi hasil PCR menggunakan *agarose gel* 1.5%, pewarnaan *SYBR safe* dan marker 100 bp.

Produk PCR dari isolat yang positif memiliki pita amplicon pada panjang 1540 bp selanjutnya dipurifikasi menggunakan enzim nuklease (*ExoSAP PCR product Cleanup Reagent*, Thermo Fisher Scientific, USA) kemudian dilakukan tahap *cycle sequencing* menggunakan *BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1* (Applied Biosystems, USA) dan 3 pasang primer sebagai berikut : BSF8/20 (F) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', BSF517/17 (R) 5'-GCCAGCAGCCGCGGTAA-3'), BSF1099/16 (F) 5'-GYAACGAGCGCAACCC-3', BSR1541/20 (R) 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', BSR114/16 (F) 5'-GGGTTGCGCTCGTTRC-3', BSR534/18 (R) 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'.. Produk hasil *cycle sequencing* dipurifikasi menggunakan *BigDye X Terminator Purification kit* (Applied Biosystems, USA). Produk purifikasi *cycle sequencing* selanjutnya dimasukkan ke mesin *DNA sequencer* (ABI 3500, Applied Biosystems, USA) untuk menentukan susunan basa. Raw data hasil sekuensing akan dianalisis menggunakan software *sequencing analysis* dan penyambungan sekuen dari setiap primer menggunakan software *seqscape analysis*, selanjutnya sekuen konsensus akan disejajarkan dengan reference sekuen

di GenBank (NCBI) melalui *tool Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* untuk mengetahui identitas sekuen hasil sekuensing.

5. Uji Sensitifitas Antibiotik

Bakteri yang telah teridentifikasi sebagai bakteri *Enterococcus* menggunakan metode PCR dan DNA sekuensing selanjutnya diuji sensitifitas antibiotik menggunakan metode Agar Dilusi. Isolat probiotik diuji sensitifitas antibiotik terhadap delapan jenis antibiotik dari yaitu ampicillin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, eritromisin, clindamisin, tetrasiklin dan kloramfenikol.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) antibiotik diinterpretasikan menggunakan *Guidance on the Assesment of Bacterial Susceptibility to Antimicrobial of Human and Veterinary Importance* (EFSA, 2012). Bakteri *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, dan *S. aureus* ATCC 29213 digunakan sebagai bakteri kontrol negatif yang sensitif terhadap antibiotik. Nilai konsentrasi minimal yang menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecium* untuk menentukan sensitifitas bakteri terhadap antibiotik terdapat dalam Tabel 1.

Stock solution antibiotik dibuat pada

konsentrasi empat tingkat di atas nilai *cut-off value* atau nilai batas KHM masing-masing antibiotik dinyatakan resistan. Selanjutnya antibiotik dilarutkan menggunakan pelarut yang sesuai dan difilter diameter 0,22 μm . Antibiotik diencerkan secara seri sehingga diperoleh larutan standar antibiotik dengan 6 konsentrasi di bawah konsentrasi *stock solution* antibiotik dan pengenceran menggunakan akuades steril. Media MHA untuk uji resistansi dibuat dengan perbandingan 1 bagian larutan serial standar antibiotik dan 9 bagian media MHA.

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media HIA dan diinkubasikan selama 18–24 jam pada suhu 37°C, kemudian sebanyak 4–5 isolat dilarutkan pada 2 ml NaCl fisiologis dan kekeruhannya disamakan dengan larutan 0,5 *Mc Farland*. Biakan bakteri diencerkan 1:10 (0,5 ml bakteri dalam 4,5 ml NaCl fisiologis) sehingga didapatkan konsentrasi bakteri 1×10^7 CFU/ml. Larutan bakteri tersebut (2 μl) diinokulasikan menggunakan replikator pada media MHA yang telah mengandung antibiotik lalu diinkubasi 37°C selama 16–20 jam. Pengamatan dilakukan untuk mengamati pertumbuhan koloni bakteri.

Tabel 1. Microbiological Resistance cut-off values (mg/l) (EFSA, 2012)

No.	Jenis Antibiotik	Cut-Off Value (mg/l)
		<i>Enterococcus faecium</i>
1	Ampisillin	2
2	Gentamisin	32
3	Kanamisin	1024
4	Streptomisin	128
5	Erythromisin	4
6	Clindamisin	4
7	Tetrasiklin	4
8	kloramfenikol	16

6. Uji Identifikasi Gen Penyandi Resistansi

Berdasarkan hasil uji sensitifitas antibiotik hanya bakteri yang resistan terhadap antibiotik tertentu yang akan diuji deteksi keberadaan gen penyandi resistansi untuk mengetahui sifat resistansi dapatan atau intrinsik. Deteksi target gen penyandi resistan disesuaikan dengan hasil uji sensitifitas antibiotik misalnya bakteri yang resistan antibiotik tetrasiklin akan dideteksi gen penyandi resistan golongan tetrasiklin antara lain *tetM* dan *tetK*.

Target gen penyandi resistansi, sekuen primer, konsentrasi primer, suhu anealing dan target amplicon terdapat pada Tabel 2. Amplifikasi

DNA menggunakan *HotStarTaq® Master Mix Kit* dengan volume total sebanyak 20 µl yang terdiri dari 8,75 µl *HotStarTaq*, 0,7 µl primer *forward*, 0,7 µl primer *reverse*, 3,85 µl dH₂O dan 5 µl DNA *template* (10X). Proses PCR meliputi siklus pre denaturasi 95°C selama 10 menit, dilanjutkan 30-35 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* (sesuai Tabel 2) selama 1-1.30 menit, ekstensi suhu 72°C selama 1 menit, ekstensi akhir suhu 72°C selama 10 menit. Visualisasi hasil PCR menggunakan *agarose gel* 1,5%, pewarnaan *SYBR safe* dan marker 100 bp.

Tabel 2. Target Gen Resistan, Sekuen Primer, Amplicon, dan Suhu Annealing

Antibiotik	Gen resistan	Sekuen Primer	Panjang Amplicon/ Annealing
Tetrasiklin	<i>tetM</i> ^a [25 µM]	F : GTTAAATAGTGTTCCTGGAG R : CTAAGATATGGCTCTAACAA	657 bp/ 56°C, 1'
	<i>tetK</i> ^a [20 µM]	F : TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R : GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	697 bp/ 55°C, 1,5'
Kloramfenicol	<i>cfr</i> ^b [10 µM]	F : CTAAGATATGGCTCTAACAA R : ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	746 bp/ 49°C, 1'
	<i>Cat</i> ^c [20 µM]	F : TTAGGTTATTGGGATAAGTTA R : GCATGRTAACCATCACAWAC	300 bp/ 48°C, 1'
	<i>fexA</i> ^d [10 µM]	F : G TACTTGTAGGTGCAATTACGGCTGA R : CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC	1272 bp/ 57°C, 1'
Eritromisin	<i>ermD/ermK1a</i> ^e [5 µM]	F : AGGCTCTGTTTGTGTATG R : TGGAGGGGGAGAAAATG	814 bp/ 55°C, 1'
	<i>ermD/ermK2a</i> ^e [10 µM]	F : GCAGACCGCCTGTGATTTTTTATG R : CAGGGACATCTGAATCCC	970 bp/ 53°C, 1'
	<i>ereA</i> ^f [10 µM]	F : GCCGGTGCTCATGAACTTGAG R : CGACTCTATTTCGATCAGAGGC	419 bp/ 52°C, 1'
	<i>ermA</i> ^g [10 µM]	F : TCTAAAAAGCAT GTAAAAGAA R : CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645 bp/ 52°C, 1'
	<i>ermB</i> ^h [10 µM]	F : GAAAAGRTACTCAACCAAATA R : AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	642 bp/ 52°C, 1'

Antibiotik	Gen resistan	Sekuen Primer	Panjang Amplikon/ Annealing
Aminoglikosida	aac(6')-aph(2□) ⁱ [10 µM]	F : GAAAAGRTACTCAACCAAATA R : CACTATCATAACCACTACCG	220 bp/ 60°C, 1'
Gentamisin	aadB ⁱ [10 µM]	F : CACAACGCAGGTCACATTGATA R : GGTACTTCATCGGCATA	414 bp/ 55.4°C, 1'
Aminoglikosida	Aph ⁱ [10 µM]	F : ACAAGATGGATTGCACGCAGGT R : CGGCCACAGTCGATGAAT	624 bp/ 59.7°C, 1'
Makrolida, Linkosamin, Streptogramin (MLS)	erm34 ^k [10 µM]	F : GAGCTTAAAAAATGA AAAA	846 bp/ 55°C, 1'

Catatan: ^a: Aarestrup *et al.*, 2000, ^b: Kehrenberg dan Schwarz. 2006, ^c: Hummel *et al.*, 2006, ^d: Kehrenberg dan Schwarz. 2005, ^e: Adimpong *et al.*, 2012, ^f: Van *et al.*, 2008, ^g: Seppala *et al.*, 1993, ^h: Sutcliffe *et al.*, 1996, ⁱ: Van de Klundert dan Vliegenthart, 1993, ^j: Wang *et al.*, 2019, ^k: Bozdogan *et al.*, 2003.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Fisik dan Kontaminasi Bakteri Patogen Pada Produk Probiotik.

Berdasarkan hasil dari uji fisik semua sampel dinyatakan memenuhi persyaratan untuk keseragaman warna, bebas dari partikel asing, dan homogen. Adapun untuk uji kontaminasi didapatkan, semua sampel bebas dari kontaminasi *Salmonella sp*, *E. coli*, *Streptococcus sp*, dan *Pseudomonas sp*. (Tabel 3). Uji kontaminasi merupakan parameter keamanan yang sangat penting bagi untuk produk probiotik dan semua produk probiotik harus bebas kontaminasi dari empat bakteri tersebut

Penarikan beberapa produk probiotik

dari peredaran pernah dilakukan oleh satu perusahaan produsen probiotik di Eropa yang disebabkan adanya kontaminasi *P. aeruginosa*, hal ini diketahui setelah diuji oleh laboratorium pihak ketiga untuk menjamin kualitas produk probiotik. Salah satu produk yang ditarik adalah probiotik untuk bayi, bakteri kontaminan tersebut dapat mengakibatkan infeksi pada bayi dan pasien imunodefisiensi. Pada kasus tersebut, sebanyak 2 lot produk ditarik dari peredaran (Anonymous, 2021). Selain itu, juga ditemukan juga kasus kontaminasi jamur *Rhizopus oryzae* pada probiotik, kontaminasi kapang ini sangat berbahaya karena dapat menginfeksi sinus, paru-paru, usus dan kulit yang disebut mucormikosis (Kroll D, 2014).

Tabel 3. Hasil Uji Mutu Produk Probiotik

Jenis Uji	Parameter	Jumlah MS	Jumlah TMS
Hasil Uji Fisik	Warna	20/20 (100%)	0/20 (0%)
	partikel asing	20/20 (100%)	0/20 (0%)
	Homogenitas	20/20 (100%)	0/20 (0%)
Uji Kontaminasi	<i>Salmonella sp</i>	20/20 (100%)	0/20 (0%)
	<i>E. coli</i>	20/20 (100%)	0/20 (0%)
	<i>S. aureus</i>	20/20 (100%)	0/20 (0%)
	<i>P. aeruginosa</i>	20/20 (100%)	0/20 (0%)

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

2. Uji Kandungan Bakteri Probiotik

Produk probiotik yang diuji dalam kegiatan ini merupakan produk probiotik yang terdiri dari 3-5 campuran bakteri, kapang, dan khamir. Empat sampel mengandung *E. faecium*, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae*; 4 sampel mengandung *E. faecium*, *Lactobacillus sp*, *S. salivarius*; 4 sampel mengandung *E. faecium*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *B. animalis* dan *P.acidilactici*; sedangkan 8 sampel mengandung *Enterococcus sp*, *Lactobacillus sp*, *Bifidobacterium sp*, dan *Pediococcus sp*. Pengujian kandungan bakteri dan jamur pada produk probiotik bertujuan untuk mengetahui mutu probiotik dengan menguji viabilitas bakteri dan jamur sesuai dengan jumlah yang tertera pada kemasan produk. Pada pengujian kandungan bakteri *Enterococcus* dari 20 sampel terdapat 16 sampel memiliki jumlah kandungan *Enterococcus* yang memenuhi persyaratan yang ditentukan pada kemasan produk, sedangkan empat sampel lainnya tidak memenuhi persyaratan kandungan bakteri.

Bentuk sediaan sampel probiotik yang diuji adalah semua sediaan kering berupa serbuk yang dikemas ulang dalam jumlah 200-500 gram/pak yang berasal dari produk kemasan besar dengan jumlah minimal 10 kg. Empat sampel probiotik yang tidak memenuhi jumlah minimal bakteri merupakan produk probiotik bentuk serbuk. Jumlah bakteri dan jamur yang tidak memenuhi jumlah persyaratan dapat disebabkan antara lain karena kurangnya homogenitas saat proses pengambilan sampel probiotik untuk dikemas dalam jumlah yang lebih kecil.

Sediaan sampel berbentuk serbuk umumnya telah diberi perlakuan dehidrasi/ pengeringan sehingga menjadi anhidrat dan membentuk spora sehingga bakteri menjadi inaktif dan tahan pada tekanan suhu, radiasi dan bahan kimia (Veterlund *et al.*, 2012). Proses dehidrasi produk probiotik dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu dengan metode *freeze drying*, *spray drying*, *fluidized bed drying* atau *vaccum drying*. Proses dehidrasi ini dapat mengakibatkan tekanan pada bakteri sehingga produk biasanya di lapisi oleh bahan pelapis. Pelapisan ini membentuk penghalang fisik yang melindungi probiotik dari reaksi oksidasi, pH rendah, cairan empedu dan memperpanjang masa simpan produk dengan menggunakan tepung kentang, $CaCl_2$, kasein, pektin, maupun alginate (Marcial-Coba MS., 2019).

Titik kritis pembuatan produk probiotik bentuk serbuk terdapat pada tahap proses pelapisan dan dehidrasi yang membutuhkan peralatan dan pemilihan metode yang tepat yang akan mempengaruhi viabilitas dari bakteri, kapang dan khamir yang digunakan dalam probiotik (Marcial-Coba MS., 2019). Paparan suhu tinggi selama pengeringan dapat membunuh sebagian besar sel vegetatif selama proses pengeringan, sehingga sangat penting mempertahankan viabilitas selama proses pengeringan karena hal ini menjadi kendala utama untuk keberhasilan produksi probiotik (Meng *et al.*, 2008). Mikroorganisme probiotik umumnya dihasilkan melalui proses fermentasi dengan suhu dan pH spesifik spesies dan strain, dan sebagian besar dikeringkan dengan pengeringan beku atau proses pengeringan

Tabel 4 Jenis Sediaan Sampel Probiotik dan Hasil Uji Kandungan

Bentuk sediaan	Produsen	Jumlah sampel	Uji Kandungan Bakteri	
			MS	TMS
Serbuk/granul	Impor	20	4	16

semprot. Probiotik untuk nutrisi ternak perlu dipertahankan kelangsungan hidupnya selama proses produksi, penyimpanan dan penanganan, dan kontrol kualitas diperlukan untuk memastikan hal ini (FAO, 2016).

Semua sampel yang diuji kandungan bakteri, kapang dan khamir masih belum kadaluarsa. Beberapa standar dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) dan EFSA menyarankan pengujian kandungan bakteri dan jamur dilakukan pada akhir dari masa kadaluarsa (BPOM 2016; EFSA 2017). EFSA (2017) mengeluarkan panduan *Guidance on the identity, characterisation and conditions of use of feed additives* yang mengatur tentang identitas, nama imbuhan, kualitas, kuantitas dan kemurnian, stabilitas/jaminan masa kadaluarsa dan homogenitas. Sedangkan di Indonesia, produk probiotik yang digunakan pada hewan diatur dalam Keputusan Menteri Pertanian No. 695/Kpts/TN.260/8/96 tentang Tata Cara Pendaftaran dan Pengujian Mutu Obat hewan. Pada label semua sampel probiotik dinyatakan jumlah bakteri pada kisaran 10^6 - 10^{10} CFU/g. Sebanyak 32 dari 40 sampel (80%) mengklaim memiliki kandungan lebih dari 10^8 - 10^{10} cfu/g. Beberapa produk menunjukkan probiotik merupakan produk *dependent dose*, yaitu dosis yang rendah pun tetap memiliki efek yang positif. Namun, jumlah yang lebih tinggi memiliki efek terbaik dan mampu menahan infeksi bakteri patogen. Produk probiotik yang diuji dalam kegiatan pengkajian ini diaplikasikan untuk berbagai jenis hewan yaitu, sapi, babi dan ayam, tetapi tidak dituliskan dosis yang untuk masing-masing jenis hewan. Dosis penggunaan untuk setiap jenis hewan sangat penting karena terdapat berbagai faktor yang mempengaruhi efektifitas probiotik, antara lain toleransi asam, cairan empedu, kemampuan perlekatan pada usus hewan target serta informasi yang menggambarkan sifat probiotik

secara *invitro* dan *in vivo* perlu dicantumkan (Weese dan Martin, 2011).

3. Identifikasi Kandungan Bakteri Probiotik

EFSA dan FAO dalam ketentuan tentang persyaratan keamanan produk probiotik/*Qualified Presumption of Safety* (QPS) sangat menekankan pentingnya uji identifikasi terhadap mikroorganisme yang digunakan dalam produk probiotik (FAO, 2016; EFSA, 2017). FAO dalam ketentuan *Probioticin Animal Nutrition* (2016) telah menetapkan daftar mikroorganisme yang dapat digunakan dalam pembuatan probiotik serta unit taksonomi untuk persyaratan keamanan yaitu menetapkan identitas, informasi tentang mikroorganisme, kemungkinan adanya sifat patogen, dan target penggunaan probiotik. Identitas mikroorganisme yang digunakan dalam produk probiotik harus diidentifikasi sampai level spesies dan strain (FAO, 2016).

Pentingnya identifikasi sampai level strain terhadap mikroorganisme yang digunakan dalam probiotik karena terkait beberapa risiko yaitu dapat terjadi kesalahan identifikasi mikroorganisme atau produk probiotik memiliki kandungan yang berbeda dari yang tercantum pada label. Kesalahan identifikasi dapat disebabkan kesalahan identifikasi *seed* dari awal atau *master seed* yang terkontaminasi saat penyimpanan. Pada pengkajian ini, isolat diperoleh dari sampel probiotik dan diidentifikasi secara fenotipik dan genetik. Fenotip yaitu secara makroskopis melihat morfologi koloni, masing-masing sampel probiotik dipilih satu koloni yang mencari sesuai target bakteri yaitu *Enterococcus sp* (Gambar 1) dan identifikasi secara genetik menggunakan PCR dan DNA sekuensing target 16s.

Identifikasi koloni bakteri dari sampel probiotik yang mengandung 3-4 jenis bakteri dilakukan dengan cara mengamati koloni bakteri

yang tumbuh di media spesifik tumbuhnya bakteri *Enterococcus sp* yaitu di media KF yang ditampilkan pada Gambar 1. Koloni bakteri *Enterococcus sp* koloni berukuran kecil 0,5-1 mm, berwarna kelabu, berbentuk bulat, halus, dan menonjol (Wardhana,2008).

Isolasi dan identifikasi bakteri target *Enterococcus sp* agak sulit dilakukan dengan menggunakan metoda kultur dan isolasi pada media uji, karena sampel probiotik mengandung 3-4 bakteri dan beberapa sampel mengandung kapang dan khamir. Sampel probiotik dalam kajian ini mengandung bakteri campuran selain mengandung *Enterococcus sp* juga mengandung bakteri asam laktat, dan khamir *S. cerevisiae*. Selain itu, kesulitan isolasi dan identifikasi pada probiotik campuran juga bisa disebabkan karena kandungan bakteri yang menurun dari yang seharusnya. Pada beberapa

sampel yang diuji, ketika dilihat pada sertifikasi hasil uji *master seed* bakteri sebagai bahan baku yang terdapat dalam dokumen registrasi sampel, pemilihan *master seed* hanya dilakukan berdasarkan identifikasi secara morfologi dan biokimia saja dan tidak ada identifikasi lengkap secara genotip.

Hasil uji identifikasi bakteri probiotik menggunakan metode DNA sekuensing terdapat pada Tabel 4. Uji identifikasi DNA sekuensing menunjukkan bahwa produk probiotik (nomor 4 dan 5) yang mengandung bakteri *Enterococcus sp*. mampu dideteksi hingga level spesies yaitu sebagai *E. faecium*. Sedangkan produk probiotik nomor 1, 2 dan 3 yang mengandung *E. faecium* dengan uji DNA sekuensing mampu dideteksi hingga level spesies sebagai bakteri *E. faecium*.



Gambar 1. Morfologi Koloni Bakteri *Enterococcus sp*

Tabel 5. Hasil Uji Identifikasi Bakteri *Enterococcus* dari Probiotik

No Produk	Jumlah isolat	Kode Isolat	Kandungan pada Label	Sekuensing 16 S	
				Spesies	Kesesuaian Indetitas
1	4	PB-0012021-PB-0042021	<i>faecium</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>E. faecium</i>	100%
2	4	PB-0172021-PB-0202021	<i>E. faecium</i> , <i>Lactobacillus</i> sp, <i>Streptococcus salivarius</i>	<i>faecium</i>	100%
3	4	PB-0292021-PB-0322021	<i>E. faecium</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>P. acidilactici</i>	<i>E. faecium</i>	98.53%
4	4	PB-0332021-PB-0362021	<i>Enterococcus spp</i> , <i>Lactobacillus</i> sp, <i>Pediococcus</i> sp, <i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>faecium</i>	98.3 %
5	4	PB-0372021-PB-0402021	<i>Enterococcus spp</i> , <i>Lactobacillus</i> sp, <i>Pediococcus</i> sp, <i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>E. faecium</i>	98,63%

Beberapa standar uji menekankan pentingnya identifikasi penetapan strain bakteri untuk produk probiotik. Identifikasi dapat dilakukan dengan metode genetik yang *reproducible* atau memberikan hasil konsisten untuk diulang ("*reproducible genetic method*"); atau "*unique phenotypic trait*", salah satunya *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) yang merupakan metode *gold standard*. Penentuan keberadaan dari elemen genetik ekstra kromosomal seperti plasmid yang dapat membantu menunjukkan jenis dan karakteristik strain. EFSA dalam *Guidance on the characterisation of microorganism used as feed additives or as production organisms* (2018) menjelaskan beberapa metode identifikasi yang dapat digunakan yaitu *Whole Genome Sequencing* (WGS) atau membandingkan sekuen bakteri yang biasa dilakukan dalam identifikasi taksonomi seperti sekuensing gen 16s atau gen lainnya.

Analisis hubungan evolusi bakteri *E. faecium* sebagian besar menggunakan metode *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), sehingga

diketahui *clade*, keberadaan *insert sequence* (IS16), elemen *Clonal Complexes* (CCs) dan elemen dapatan lainnya. Deteksi IS16 juga dapat dideteksi melalui metode WGS dan *genome hybridization*. Beberapa gen yang berperan dalam virulensi bakteri *Enterococcus faecium* adalah element IS16 yang merupakan gen yang paling banyak yang ditemukan pada *E. faecium* isolat klinis (Wernes *et al.*, 2011), gen *Esp* (*pathogenicity island marker*) juga berperan penting dalam pembentukan biofilm, infeksi endocarditis, infeksi saluran kemih (Heikens *et al.*, 2007; Heikens *et al.*, 2011), dan *hyl-like gene* berperan dalam kolonisasi di usus (Freitas *et al.*, 2010). EFSA (2021) telah memperbaharui daftar bakteri yang dapat digunakan sebagai probiotik. Bakteri *E. faecium* merupakan bakteri yang direkomendasikan dapat digunakan sebagai bakteri untuk probiotik (FAO, 2016) meskipun masih terdapat perdebatan karena adanya potensi patogen pada manusia pada kasus nosocomial (EFSA, 2012^b).

4. Pengujian Sensitifitas Antibiotik dan Deteksi Gen Penyandi Resistansi

Pengujian sensitifitas antibiotik dilakukan dengan menguji satu isolat bakteri dari tiap kemasan sampel yang telah diidentifikasi sebagai bakteri *Enterococcus*. Total terdapat 20 isolat *Enterococcus* yang diuji kepekaan antibiotik terhadap 8 jenis antibiotik yaitu ampisilin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol sesuai yang di rekomendasikan oleh EFSA (EFSA, 2012^a). Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode agar dilusi mengikuti CLSI (2021) dan nilai *cut-off value* mengacu pada EFSA (2012a) sebagaimana tersaji dalam Tabel 1. Hasil uji sensitifitas antibiotik terdapat dalam Tabel 6.

Hasil uji sensitifitas antibiotik menunjukkan bahwa semua isolat *Enterococcus* (20 isolat) resistan terhadap kloramfenikol dan eritromisin, dan terdapat 12 isolat resistan tetrasiklin. Isolat bakteri yang resistan antibiotik selanjutnya

dideteksi gen penyandi resistansi sesuai dengan target gen resistan setiap antibiotik, hasil deteksi gen penyandi resistan tersaji dalam Tabel 7. Sebanyak 20 isolat *Enterococcus* yang resistan kloramfenikol dan eritromisin hasil deteksi gen resistan menunjukkan hanya 1 isolat (PB-0042022) yang positif memiliki gen resistan terhadap eritromisin yaitu gen *ermB* dan 1 isolat (PB-0192022) yang positif memiliki gen resistan terhadap kloramfenikol yaitu gen *cat*. Sedangkan 12 isolat *Enterococcus* yang resistan tetrasiklin hasil deteksi gen resistan menunjukkan semua isolat positif memiliki gen resistan *tetK* dan *tetM*. Isolat yang secara fenotip resistan terhadap antibiotik namun secara genetik negatif gen resistan perlu dilakukan uji lanjut menggunakan metode yang lebih komprehensif sehingga diketahui gen resisten yang dimiliki dan letak gen resistan berada. Data ini sangat diperlukan untuk menentukan keamanan bakteri yang digunakan pada probiotik.

Tabel 6. Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik Bakteri *Enterococcus*

Kode Isolat	Kandungan Bakteri	Jumlah Isolat	Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik							
			KLOR	ERI	STREP	TETRA	AMPI	CLIN	GENT	KANA
PB-0012022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0022022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0032022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0042022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0172022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0182022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0192022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0202022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0292022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0302022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0312022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0322022	<i>E. faecium</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0332022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0342022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0352022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0362022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

Kode Isolat	Kandungan Bakteri	Jumlah Isolat	Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik							
			KLOR	ERI	STREP	TETRA	AMPI	CLIN	GENT	KANA
PB-0372022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0382022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0392022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB-0402022	<i>Enterococcus spp</i>	1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Total Isolat Resistan			20	20	0	12	0	0	0	0
Total Isolat Sensitif Antibiotik			0	0	20	8	20	20	20	20

Catatan : KLOR : kloramfenicol, ERI : eritromisin, STREP: streptomisin, TETRA : tetrasiklin, AMPI : ampisillin, CLIN : clindamisin, GENT : gentamisin, KANA : kanamisin

Tabel 7. Hasil Identifikasi Gen Penyandi Resistansi.

No. Produk	Nomor Sampel	Jenis Bakteri	Resistansi Antibiotik	Hasil Positif Deteksi Gen Resistan	Hasil Negatif Deteksi Gen Resistan
1	PB-0042022	<i>E. faecium</i>	kloramfenikol, eritromisin	<i>ermB</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermDk1, ermDk2</i>
2	PB-0192022	<i>E. faecium</i>	kloramfenikol, eritromisin	<i>cat</i>	<i>cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
3	PB-0292022	<i>E. faecium</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0302022	<i>E. faecium</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0312022	<i>E. faecium</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0322022	<i>E. faecium</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
4	PB-0332022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0342022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0352022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0362022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
5	PB-0372022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0382022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0392022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>
	PB-0402022	<i>Enterococcus spp</i>	kloramfenicol, eritromisin, tetrasiklin	<i>tetK, tetM</i>	<i>cat, cfr, fexA, ereA, ermA, ermB, ermDk1, ermDk2</i>

Resistensi perolehan dapat disebabkan oleh *acquired gene* atau mutasi gen pada bakteri itu sendiri. Menurut *The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed* (FEEDAP), bakteri probiotik tidak boleh digunakan jika *acquired gene* berpotensi menyebar secara horizontal namun bukan berasal dari resistansi intrinsik atau mutasi kromosomal (EFSA, 2012^a). Yamaguchi *et al.* (2013), menemukan adanya *E. faecium* dari produk probiotik di Jepang yang resistan terhadap tetrasiklin dan beta-laktam. Raghavendra *et al.* (2018) meneliti resistansi pada bakteri *E. faecium* dari probiotik yang digunakan pada ternak dan babi terhadap antibiotik yang penting dalam pengobatan. Hasilnya dari 22 produk probiotik menunjukkan resistansi terhadap antibiotik linkomisin 45.5%, tetrasiklin 18.2%, daptomisin 18.2%, siprofloksasin 18.2%, kanamisin 13.6% dan terdapat 18.2% (4 isolat) MDR dengan fenotip resistansi terhadap antara 3-6 kelas antibiotik.

Pada hasil pengkajian ini ditemukan 12 isolat *E. faecium* MDR terhadap tiga antibiotik yaitu kloramfenikol, eritromisin dan tetrasiklin. Sifat MDR sering terkait dengan perpindahan bebas dari elemen genetik melalui transfer gen horizontal dan berbagi beberapa sifat genetik adaptif, seperti penentu sifat resistansi dan elemen genetik seluler (Mikalsen *et al.*, 2015). Pada kelompok *Enterococcus*, transfer gen secara horizontal akan membantu adaptasi, memungkinkan akuisisi resistansi dan faktor penentu virulensi dengan demikian akan memberikan keuntungan selektif dan meningkatkan kolonisasi bakteri di usus (Manson *et al.*, 2010; Mikalsen *et al.*, 2015).

Kajian sensitifitas pada 128 *E. faecium* dari kasus klinis manusia dan produk probiotik komersial terhadap 16 jenis antimikroba ditemukan 2 isolat secara fenotip resistan eritromisin dan salah satu isolat positif memiliki gen resistansi

ermB (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Rizzotti *et al.* (2009) melaporkan transferabilitas gen *tetM* dari beberapa spesies *Enterococcus*, termasuk *E. faecium* ke spesies lain, contohnya *Listeria*. Pada kajian ini ditemukan 1 isolat *E. faecium* yang secara fenotip resistan eritromisin dan secara genetik memiliki gen resistansi *ermB* dan 12 isolat resistan tetrasiklin dan semuanya memiliki gen resistansi *tetK* dan *tetM* yang terletak di plasmid. Ashraf dan Shah (2011) mengkaji bahwa keberadaan gen resistansi pada plasmid memungkinkan penyebaran resistansi tetrasiklin terhadap bakteri yang berpotensi patogen, karena *Enterococcus* sering ditemukan di habitat yang sama dengan *Listeria* dan penyebaran resistansi horizontal dimungkinkan di peternakan atau fasilitas pengolahan makanan.

Evaluasi gen resistansi pada probiotik yang dilakukan oleh Baumgardner *et al.* (2021) pada 50 produk probiotik dengan mendeteksi 8 gen resistansi yang dapat ditransfer. Terdapat 47 sampel (94%) produk memiliki paling tidak satu jenis gen resistansi. Kejadian resistansi ini menunjukkan tingginya risiko kemampuan bakteri dalam produk probiotik untuk menyebarkan gen resistansi saat diaplikasikan dalam saluran pencernaan.

Hal penting lainnya yang perlu mendapat perhatian terhadap penggunaan bakteri *E. faecium* adalah adanya kecenderungan spesies ini menjadi resistansi terhadap antibiotik, termasuk menjadi MDR karena mutasi genetik atau adanya perolehan gen resistansi melalui elemen genetik seluler (Miller *et al.*, 2014). Kehadiran gen resistansi yang dapat ditransfer dan adanya faktor penentu virulensi dalam strain *Enterococcus* memang memicu perdebatan tentang penggunaannya dalam probiotik (Hummel *et al.*, 2007). Sebuah studi tentang analisis genom komparatif berbasis *pyrosequencing* dari strain *E. faecium* mengungkapkan bahwa gen

yang terlibat dalam ketahanan di lingkungan, kolonisasi, dan virulensi dapat dengan mudah diperoleh oleh *E. faecium* (vanSchaik *et al.*, 2010).

Metode *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE) umum digunakan untuk *genotyping* *Enterococcus* dan menentukan keragaman antara probiotik strain *E. faecium* (Kuhn *et al.*, 1995; Tomayko dan Murray, 1995). Hasil kajian analisis metode PFGE terhadap strain *E. faecium* dari probiotik untuk manusia menunjukkan sejumlah strain memiliki pola identik yang menunjukkan tipe PFGE yang sama. Strain probiotik terkelompok dengan strain *E. faecium* klinis, hal ini mengindikasikan bahwa strain klinis mungkin terjadi reisolasi pada strain probiotik (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Upaya pemilihan strain *E. faecium* yang tidak berasal dari isolat klinis dan tidak membawa gen resistan dapat menggunakan metode identifikasi lain yang lebih komprehensif dan diskriminatif dalam menilai keragaman genetik dan *genotyping* *E. faecium* yaitu metode MLST, SNP dan WGS (Raghavendra *et al.*, 2018).

Negara-negara di Eropa melalui EFSA mensyaratkan tidak adanya gen resistan pada saat pemilihan kuman sebagai *master seed* probiotik, yaitu bakteri tidak dapat digunakan sebagai probiotik jika ditemukan kejadian resistansi secara fenotipik dan genotipik. Selain itu, perlu di kaji lokasi gen resistan apakah di plasmid atau di kromosom. Probiotik yang mengandung gen resistan yang terletak di plasmid dapat menjadi resevoir atau perantara yang mentransfer kemampuan resistansi antibiotik ke mikrobiota lain (EFSA, 2016).

Menurut EFSA, bakteri asam laktat terutama *Enterococcus* perlu dilakukan kajian keamanan karena berpotensi sebagai bakteri patogen (EFSA, 2012^b). *European Food Safety Association Guidance on the safety assessment of Enterococcus faecium in animal*

nutrition (2016) menyatakan bakteri *E. faecium* merupakan bakteri komensal pada manusia dan hewan. Beberapa strain bersifat patogen potensial pada manusia dan penyebab infeksi *nosocomial* (EFSA, 2012^b). *Enterococcus* terutama *E. faecium* adalah patogen oportunis dan di Amerika Serikat merupakan patogen paling prevalen pada kasus *nosocomial* (Arias dan Murray, 2012). FEEDAP tahun 2012 telah mengeluarkan dokumen panduan untuk penilaian keamanan dan efikasi bakteri *E. faecium* sebagai imbuhan pakan. Namun uji toksikologi yang direkomendasikan dalam dokumen ini tidak dirancang untuk mengidentifikasi virulensi agen mikrob. EFSA telah menerima banyak pertanyaan tentang cara menilai keamanan *E. faecium* sebagai zat tambahan. Hal ini disebabkan karena meningkatnya insiden infeksi *E. faecium* di rumah sakit dan pendekatan ilmiah baru yang dikembangkan secara genomik serta pemahaman yang lebih baik tentang mengapa beberapa galur *E. faecium* menimbulkan masalah (EFSA, 2012^b).

Identifikasi kandungan probiotik merupakan salah satu dari daftar *Qualified Presumption of Safety* (QPS) yang dibuat oleh komite EFSA yang disusun sejak tahun 2007. Daftar "*Qualified*" yang diasesmen antara lain, tidak adanya faktor virulensi, metabolit toksin, resistensi antimikroba dan kemampuan mentransmisi resistensi antimikroba (EFSA, 2010). Hingga Juni 2021 EFSA terus melakukan pembaruan data QPS agen biologik yang dapat digunakan di produk baik untuk hewan maupun manusia dalam dokumen <https://doi.org/10.5281/zenodo.1146566>. (EFSA, 2021). Amerika Serikat melalui *Food and Drug Administration* (FDA) sejak tahun 1998 hingga sekarang telah mempublikasi daftar strain yang dapat digunakan dalam klasifikasi *Generally Recognized as Safe* (GRAS) yang dapat

diunduh di [www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set = GRASNotices](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices) . Adapun Jepang, Thailand dan Cina juga telah mengeluarkan daftar bakteri yang dapat digunakan dalam produk makanan (Laulund *et al.*, 2017).

Peraturan mengenai registrasi produk probiotik telah dibuat oleh beberapa kementerian di Indonesia. Produk probiotik untuk manusia telah diatur dalam Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI No. 13 tahun 2016 tentang pengawasan klaim pada label dan iklan pangan olahan. Pada peraturan ini ditetapkan tentang aspek keamanan yang meliputi strain mikroorganisme tidak menyebabkan infeksi, diketahui pola resistansi, tidak membawa gen penyandi resistensi, sumber mikroorganisme jelas, dan ada evaluasi efek samping. Badan Pengawas Obat dan Makanan juga telah mengatur secara spesifik tentang cara pendaftaran probiotik dalam Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan No 17 tahun 2021 tentang Pedoman Penilaian Produk Suplemen Kesehatan Mengandung Probiotik. Peraturan ini bertujuan untuk melindungi masyarakat dari peredaran suplemen kesehatan mengandung probiotik yang tidak sesuai dengan persyaratan keamanan, kemanfaatan, dan mutu, perlu mengatur pedoman penilaian produk suplemen kesehatan mengandung probiotik.

Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia dalam Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. KEP.35/DJ-PB/2012 telah membahas dan menetapkan tentang produk probiotik, salah satunya tentang Tata Cara Pengisian Formulir Teknis Obat Ikan telah mencantumkan syarat mikroba yang digunakan yaitu pada Bab III(C) tentang Formulir C tentang pemeriksaan obat jadi, mencakup: 1). Bukan berasal dari mikroba yang patogen; 2). Maksimum mengandung 5 spesies dan sudah ada di Indonesia; 3). Cara

identifikasi dan penetapan jumlah mikroba; 4). Cara penentuan tidak adanya mikrob patogen; 5). Cara pemeriksaan sterilitas; dan 6). Sertifikat Analisa terbaru, yang mencantumkan spesifikasi, persyaratan dan hasil uji dari produk yang bersangkutan, ditandatangani dan disahkan oleh personel *Quality Control*.

Beberapa peraturan telah dikeluarkan oleh Kementerian Pertanian Republik Indonesia terkait produk probiotik antara lain yaitu; Keputusan Menteri Pertanian No. 695/Kpts/TN.260/8/96 tentang Tatacara Pendaftaran dan Pengujian Mutu Obat hewan. Obat hewan yang didaftarkan harus dilengkapi dengan syarat-syarat yang memberikan penjelasan dalam bentuk dokumen obat hewan. Selain itu, Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia No 14/PERMENTAN/PK.350/5/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan belum mengatur probiotik secara spesifik. Probiotik masuk dalam klasifikasi premiks atau sediaan yang mengandung bahan obat hewan yang diolah menjadi imbuhan pakan (*Feed additive*) atau Pelengkap Pakan (*Feed Supplement*) Hewan yang pemberiannya dicampurkan ke dalam pakan atau air minum hewan yang dalam dosis dan penggunaannya harus bermutu, aman dan berkhasiat.

Kementerian Pertanian Republik Indonesia belum mencantumkan proses pendaftaran produk probiotik secara spesifik dalam suatu peraturan tersendiri. Hasil kajian ini diharapkan dapat menjadi bahan masukan ilmiah dalam pembuatan kebijakan ketentuan atau peraturan terkait pentingnya aspek keamanan pada pembuatan produk probiotik yang dimulai dari pemilihan *seed* mikroorganisme, proses produksi yang bermutu serta pengujian produk akhir yang menjamin mutu dan keamanan produk probiotik. Kajian ini masih membutuhkan pengujian lanjut yang lebih komprehensif salah satunya menggunakan metode *whole genome*

sequencing (WGS) sehingga dapat menyentuh sisi identifikasi yang lebih diskriminatif, identifikasi faktor virulen, gen resisten yang dimiliki pada plasmid dan kromosom dan keberadaan gen toksigenik.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dua puluh sampel probiotik yang mengandung *Enterococcus* telah diuji mutu, hasilnya semua sampel memenuhi syarat uji fisik, uji kontaminasi dan uji identifikasi, terdapat empat sampel tidak memenuhi syarat jumlah kandungan bakteri. Hasil uji sensitifitas antibiotik diperoleh semua isolat resistan kloramfenikol dan eritromisin, 12 isolat resistan tetrasiklin dan 12 isolat MDR dan ditemukan gen resistan *cat*, *ermB*, *tetK* dan *tetM*. Berdasarkan kajian ini disimpulkan bahwa terdapat sampel probiotik *Enterococcus* yang tidak memenuhi uji mutu dan adanya risiko bahaya resistan terhadap beberapa antibiotik serta ditemukannya gen resistan yang terletak di plasmid yang berpotensi menyebarkan sifat resistansi.

Uji sensitifitas antibiotik teknik agar dilusi sangat kompleks dan dibutuhkan ketelitian tinggi sehingga disarankan menggunakan alat AST yang otomatis. Diperlukan uji yang komprehensif untuk mendeteksi gen resistan, gen toksin dan gen virulen serta peraturan obat hewan dari Kementerian Pertanian yang spesifik untuk registrasi dan pengujian probiotik yang menyentuh aspek keamanan.

DAFTAR PUSTAKA

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen L B. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.*

37(2):127-37.

Anonymous. 2021. Probiotic Recalled Due to Risk of Bacterial Contamination. Terdapat dalam <https://www.consumerlab.com/recalls/14602/probiotic-recalled-due-to-risk-of-bacterial-contamination/POSTED-NOVEMBER-2,2021>. Diunduh pada tanggal 12 Desember 2022.

[AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2002. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *J. AOAC Int.* 85: 1–5.

Arias CA dan Muray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat.Rev. Microbiol.* 10:266-278. doi:10.1038/nrmicro2761.

Ashraf R dan Shah NP. 2011. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *Int. Food Res. J.* 18:837–853.

Baumgardner RM, Berreta A, Kopper JJ. 2021. Evaluation of commercial probiotics for antimicrobial resistance genes. *Can Vet J.* 62(4):379-383.

Bimantara JG, Ramadhan F, Diveranta A, Khaerudin. 2021. Penyalahgunaan Antibiotik di Peternakan Ayam Broiler. Jakarta. Kompas. Tersedia dalam https://www.kompas.id/baca/ekonomi/2021/07/16/penyalahgunaan-antibiotik-di-peternakan-ayam-broiler?loc=metered_register_wall-mrw2&status=sukses_login&status_login=login. Diunduh pada tanggal 15 November 2022

Bozdogan B, Esel D, Whitener C, Browne FA, Appelbaum PC. 2003. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *J. Antimicrob Chemother.* 52(5):864-8.

- Cai H, Archambault M, Prescott JF. 2003. 16S RNA Sequence-based Identification of Veterinary Clinical Bacteria. *J. Vet Diagn Invest.* 15:465-469.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 31th ed. Wayne (US). CLSI Institute.
- De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry. *J. Appl Environ. Microbiol.* 69:3456–3461.
- Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märtlbauer E, Granum PE. 2021. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel).* 28;13(2):98.
- [EFSA] The European Food Safety Authority. 2010. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2010 update). *EFSA Journal.* 8(12):1944.
- [EFSA] The European Food Safety Authority. Panel on Additives and Products or Substances in Animal Feed (FEEDAP). 2012a. Guidance assesment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*;10(6):2740.[10pp.] doi:10.2903/j.efs.a.2012.2740.
- [EFSA] The European Food Safety Authority. Panel on Additives and Products or Substances in Animal Feed (FEEDAP). 2012b. Guidance on the safetyassesment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal.* 10(5):2682. [10 pp.] doi:102903/j.efs.a.2012.2682.
- [EFSA] The European Food Safety Authority. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2014. Guidance on the assesment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. *EFSA Journal.* 12(5):3665, 10 pp. doi:10.2903/j.efs.a.2014.3665.
- [EFSA] The European Food Safety Authority. 2017. Guidance on the identity, characterisation and conditions of use of feed additives. *EFSA Journal.* 15(10):5023
- [EFSA] The European Food Safety Authority. 2018. Guidance on the characterisation of microorganism used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal.* 16(3):5206.
- [EFSA] The European Food Safety Authority. 2021. Updated list of QPS status recommended biological agents in support of EFSA risk assessments. *EFSA Journal.* 19(7):6689.
- [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1-11.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2016. Probiotic in animal nutrition: Production, impact and Regulation. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Werner G, Laverde-Gomez JA, Cantón R, Peixe L, Baquero F, and Coque TM. 2010. Global Spread of the hlyEfm Colonization-Virulence Gene in Megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster. *J Antimicrob Chemother.* 54(6): 2660–2665.
- Heikens E, Bonten MJM, and Willems RJL. 2007. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J. Bacteriol.* 89:8233-8240.
- Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, van Luit-Asbroek M, Oostdijk EAN, Bonten MJM, Murray BE, and Willems RJL. 2011.

- Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect.* 13:1185-1190.
- Hummel AS, Hertel C, Holzappel WH, Franz CMA. 2007. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Feb. Vol. 73, No. 3. p. 730–739. doi:10.1128/AEM.02105-06.
- Hummel A, Holzappel WH, Franz CM. 2007. Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:1–7. doi:10.1016/j.syapm.2006.02.004.
- ISO 6888-2:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). 1; 7.
- Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23 S ribosomal RNA at A2503. *J Mol. Microbiol.* 57: 1064–1073.
- Kehrenberg C dan Schwarz S. Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fxaA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant *Staphylococcus* Isolates. *J. Antimicrob Chemother.* Apr. p. 1156–1163. Vol. 50, No. 4. doi:10.1128/AAC.50.4.1156–1163.2006.
- Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. KEP.35/DJ-PB/2012 tentang Tata Cara Pengisian Formulir Teknis Obat Ikan.
- Keputusan Menteri Pertanian No. 695/Kpts/TN.260/8/96 tentang Tata Cara Pendaftaran dan Pengujian Mutu Obat hewan.
- Kroll D. 2018. Children's Probiotic Supplement Contaminated With Disease-Causing Fungus. Terdapat dalam <https://www.forbes.com/sites/davidkroll/2014/11/18/childrens-probiotic-supplement-contaminated-with-disease-causing-fungus/?sh=5ab9e64e921f>. Diunduh pada tanggal 10 November 2021.
- Kuhn I, Burman LG, Haeggman S, Tullus K, Murray BE. 1995. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 33:2812–2817.
- Laulund S, Wind A, Derkx P M.F, Zuliani V. 2017. Regulatory and Safety Requirement for Food Cultures. *MDPI-Microorganisms.* Jun; 5(2):28. doi: 10.3390/microorganisms5020028
- Marcial-Coba MS. 2019. Low-moisture food matrices as probiotic carriers. *FEMS Microbiology Letters.* Volume 366, Issue 2, January 2019, fnz006.
- Meng X, Stanton C, Fitzgerald G, Daly C, Ross R. 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry.* 106(4): 1406–1416.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 12:1221–1236. doi:10.1586/14787210.2014.9 56092.
- Manson JM, Hancock LE, Gilmore MS. 2010. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* Pathogenicity Island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:12269–12274. doi:10.1073/pnas.1000139107.
- Mikalsen T, Pedersen T, Willems R, Coque TM, Werner G, Sadowy E, van Schaik W, Jensen LB, Sundsfjord A, Hegstad K. 2015. Investigating the mobilome in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *BMC Genomics.* 16:282. doi:10.1186/s12864-015-1407-6.
- Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI no 13 tahun 2016 tentang Pengawasan Klaim pada Label dan Iklan Pangan Olahan.
- Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI No 16 tahun 2016 tentang Kriteria Mikrobiologi dalam Pangan Olahan.
- Peraturan Menteri Pertanian Nomor 14 Permentan/ PK.350/5/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan Antibiotika sebagai AGP.
- Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan No 17 tahun 2021 tentang Pedoman Penilaian Produk Suplemen Kesehatan Mengandung Probiotik.
- Raghavendra GA, Felicia G, Xiaorong S, Jose S, Sanjeev KN, Mike DT, Mike DA, Nagaraja TG. 2018. Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* strains isolated

- from commercial probiotic products used in cattle and swine. *J. Anim. Sci.* 96:912–920 doi: 10.1093/jas/sky056.
- Rizzotti L, La Gioia F, Dellaglio F, Torriani S. 2009. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet(M), carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 96:43–52. doi:10.1007/s10482-009-9334-7.
- Seppala H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. 1993. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J. Antimicrob Chemother.* 32:885–891.
- SNI ISO 6579. 2015. Mikrobiologi bahan pangan dan pakan - Metode horizontal untuk deteksi *Salmonella spp.* 07.100.30 Mikrobiologi makanan ; 38.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt, A, Wondrack L. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *J. Antimicrob Chemother.* 40, 2562–2566.
- Tomayko JF dan Murray BE. 1995. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 33:2903–2907.
- Undang-undang Nomor 18 Tahun 2009 Tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan. Terdapat pada <https://ditjenpkh.pertanian.go.id/uploads/download/85453cb4e07dc5422595300f5d9a890f.pdf>. Diunduh pada tanggal 5 Januari 2022.
- Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Snauwaert C, Swings J, Klare I, Witte W, Van Autgaerden T, Chapelle S, Lammens C, Goossens H. 2008. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4247–4255. doi:10.1128/AEM.02474-07.
- Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int J. Food Microbiol.* 124:217–223.
- Van de Klundert, J.A.M., Vliegenthart, J.S., 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In: Persings, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (Eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* ASM, Washington, D.C., pp. 547–552.
- Van Schaik, W, Top J, Riley DR, Boekhorst J, Vrijenhoek JE, Schapendonk CM, Hendrickx AP, Nijman IJ, Bonten MJ, Tettelin H, Willems RJ. 2010. Pyrosequencing based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics.* 11:239. doi:10.1186/1471-2164-11-239.
- Vesterlund S, Salminen K, Salminen S. 2012. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *Int J. Food Microbiol* 157:319.
- Wang K , Zhang H, Feng J, Ma L, Núñez C , Wang S , Lu X. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. 2019. *J. Agric. Food Res.* 1;100006. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2019.100006> Received 17 October 2019.
- Weese JS and Martin H. 2011. Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy. *Can Vet J.* 52(1): 43-46.
- Werner G, Fleige C, Geringer U, van Schaik W, Klare I, and Witte W. 2011. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infectious Diseases* 11:80.
- [GRAS] *Generally Recognized As Safe* Terdapat dalam www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices. Diunduh pada tanggal 19 Desember 2022.
- Yamaguchi T, Miura Y, Matsumoto T. 2013. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains used in clinical practice as probiotics. *J. Infect. Chemother.* 19:1109–1115. doi:10.1007/s10156-013-0633-6.

PENGUJIAN MUTU DAN EFEKTIFITAS SERTA EVALUASI VAKSIN RABIES WRD-0012021

¹Ketut Karuni Nyanakumari Natih*, ²Rahajeng Setiawaty, ²Neni Nuryani, ²Dewi Astuti

*Pelayanan Sertifikasi Pengembangan Mutu dan Kerjasama, Unit Uji Virologi
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340*

*email: ketutkaruni@yahoo.com

ABSTRAK

Rabies merupakan salah satu penyakit zoonosis tertua penting yang dapat menimbulkan kematian. Vaksinasi pada hewan penular rabies adalah salah satu program pengendalian dan pemberantasan penyakit rabies. Mutu vaksin rabies menjadi salah satu faktor penting untuk keberhasilan program vaksinasi yang dicanangkan oleh pemerintah dalam pengendalian dan pemberantasan rabies. Unit uji virologi pada Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) telah menguji mutu sampel vaksin rabies dengan kode WRD-0012021 yang digunakan dalam program vaksinasi rabies. Sampel vaksin diuji inaktivasi dan potensi menggunakan metode sesuai Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid II Sediaan Biologik Tahun 2018. Selanjutnya sebanyak 53 sampel serum anjing yang diambil tiga minggu pascavaksinasi rabies diuji dengan menggunakan metode ELISA. Pengujian mutu vaksin rabies menunjukkan hasil memenuhi syarat, yaitu uji inaktivasi hasilnya 100% terinaktivasi sempurna dan nilai indeks proteksi 5.5. Sedangkan hasil uji ELISA dari serum anjing pascavaksinasi menunjukkan 100% serum menghasilkan *titer antibodi seropositif* dengan nilai $\geq 0,500$ IU/ml, sehingga dapat disimpulkan bahwa program vaksinasi yang dilakukan berhasil, salah satunya didukung oleh penggunaan vaksin Rabies yang bermutu.

Kata kunci: rabies, uji mutu, vaksin, ELISA

ABSTRACT

Rabies is one of the oldest and most important zoonotic diseases that can cause death. Vaccination of animals that transmit rabies is one of the programs to control and eradicate rabies. The quality of the rabies vaccine is an important factor in the success of the vaccination program launched by the government in controlling and eradicating rabies. Virology laboratory at National Veterinary Drug Assay Laboratory (NVDAL) has tested the quality of rabies vaccine samples with the code WRD-0012021 which are used in the rabies vaccination program. Vaccine samples were tested for inactivation and potency using methods according to Indonesian Veterinary Medicine Pharmacopoeia, 2nd Edition 2018 for Biologic Products. Furthermore, 53 dog serum samples were collected three weeks after rabies vaccination were tested using the ELISA method. Testing the quality of the rabies vaccine showed that the results met the requirements, namely the inactivation test resulted in 100% complete inactivation and a protection index value of 5.5. Meanwhile, the results of the ELISA test from post-vaccination dog serum showed that 100% of the serum produced seropositive antibody titers with a value of ≥ 0.500 IU/ml, so it can be concluded that the vaccination program carried out was successful, one of which is supported by the use of a quality Rabies vaccine.

Keywords: rabies, quality assay, vaccine, ELISA

PENDAHULUAN

Rabies merupakan salah satu penyakit zoonosis tertua penting yang menimbulkan ancaman bagi manusia di dunia, khususnya di Asia dan Afrika (Madhusudana et al., 2011). Rabies disebabkan oleh virus dari *Genus Lyssavirus* (dalam keluarga *Rhabdoviridae* dari ordo *Mononegavirales*) yang pertama kali ditemukan pada abad ke-4 Sebelum Masehi (SM). Virus rabies menyerang susunan syaraf pusat (SSP) mamalia yang juga dapat berakibat fatal pada manusia yang ditularkan melalui gigitan. Hampir semua infeksi manusia disebabkan oleh gigitan Hewan Penular Rabies (HPR) terutama anjing (Fook et al. 2017).

Pemerintah Indonesia melalui Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian, mencanangkan program pemberantasan rabies secara nasional dengan target bebas rabies pada tahun 2030. Rancangan untuk menjalankan program tersebut disebut sebagai “Masterplan Nasional Pemberantasan Rabies di Indonesia” dengan misi yaitu secara bertahap mengurangi rabies di Indonesia dengan tujuan akhir untuk membebaskan masyarakat Indonesia dari risiko tertular rabies. Pemberantasan rabies melalui vaksinasi massal secara terus menerus dan profilaksis pasca pajanan dengan target mengeliminasi rabies pada manusia yang dimediasi anjing di Indonesia (Ditjen PKH 2019).

Mutu vaksin rabies menjadi salah satu faktor penting untuk keberhasilan program vaksinasi yang dicanangkan oleh pemerintah dalam pengendalian dan pemberantasan rabies. Semua penelitian menunjukkan bahwa pengendalian rabies melalui vaksinasi anjing efektif dalam hal mengurangi kejadian rabies pada anjing dan/atau manusia, dan sebagian besar studi menunjukkan 70% cakupan tahunan sudah memadai. Cakupan vaksinasi, kepadatan

anjing, dan tingkat kelahiran diidentifikasi sebagai faktor penting yang mempengaruhi efektivitas vaksin rabies (*Rattanavipapong et al. 2019*).

Tujuan dari penulisan ini adalah Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) sesuai dengan tugas pokok dan fungsinya melakukan pengujian mutu terhadap vaksin rabies (WRD-0012021), dengan melakukan vaksinasi pada HPR dan mengukur tingkat kekebalan yang dihasilkan.

METODE

Waktu dan Tempat

Pengujian mutu vaksin rabies dilaksanakan di Unit Uji Virologi BBPMSOH pada sampel vaksin rabies inaktif dengan kode WRD-0012021. Pelaksanaan vaksinasi rabies dan pengambilan serum 3 minggu pasca vaksinasi dilakukan di salah satu penampungan hewan (Rainbow Sanctuary Indonesia) di Kecamatan Gunungsindur, Kabupaten Bogor pada bulan September-Oktober 2021.

Metode Pengujian Sampel

Pengujian mutu terhadap sampel vaksin rabies sesuai FOHI 2018, adalah sebagai berikut :

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.
2. Uji potensi dengan ujiantang sesuai metode Habel. 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 yaitu *Challenge Virus Standard (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.

3. Evaluasi pasca vaksinasi rabies, adalah sebagai berikut:
 - a. Pelaksanaan vaksinasi pada HPR sejumlah 53 ekor anjing, masing-masing 1 dosis secara *sub cutan* (SC).
 - b. Pengambilan serum 3 minggu pasca vaksinasi sebanyak 53 sampel dan diuji titer antibodinya dengan menggunakan *ELISAa Rabies Platelia-Rabies Kit – Bio Rad. Quantitative*.

Bahan dan Peralatan

Bahan dan alat yang digunakan pada saat pengujian mutu sampel rabies adalah : vaksin rabies inaktif (WRD-0012021), virus tantang rabies standar (CVS), *suckling mice* umur 1

hari sebanyak 2 induk , mencit umur 4 minggu sebanyak 90 ekor, *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) dan ELISA kit (*Elisa Rabies Platelia-Rabies Kit – Bio Rad. Quantitative*).

HASIL

Vaksin rabies diuji dengan beberapa metode untuk mengetahui mutunya, pengujian tersebut meliputi uji inaktivasi, uji potensi dengan mengukur indeks proteksi, dan uji serologis menggunakan ELISA Kit. Hasil uji inaktivasi pada *suckling mice* menunjukkan hasil 100 % tidak ada gejala klinis rabies pada masa pengamatan dan uji potensi dengan mengukur nilai indeks proteksi diperoleh nilai 5.5 (Tabel 1). Berdasarkan hasil pengujian mutu vaksin rabies (WRD-0012021) untuk uji ianktivasi dan potensi menunjukkan hasil sesuai dengan persyaratan mutu yang ada di dalam FOHI 2018.

Hasil uji evaluasi pascavaksinasi menggunakan metode ELISA diperoleh nilai *optical density* (OD) dengan satuan International Unit (IU) yang menunjukkan titer antibodi yang terdapat pada sampel. Titer antibodi dikatakan seropositif jika nilainya $\geq 0,500$ IU/mL yang berarti terdapat antibodi dalam darah yang mampu melindungi dari infeksi rabies. Hasil uji dengan pemberian vaksinasi sesuai dosis label vaksin menggunakan ELISA menunjukkan mampu menghasilkan titer antibodi seropositif ($\geq 0,500$ IU/mL) 100 % (53/53) (Tabel 2).

Tabel 1. Hasil Pengujian Mutu Vaksin Rabies

Nomor Sampel	Uji Inaktivasi		Uji Potensi	
	Hasil Uji	Persyaratan Mutu	Hasil Uji	Persyatan Mutu
WRD-0012021	100 % tidak menunjukkan gejala klinis rabies	100 % tidak menunjukkan gejala klinis rabies	Nilai indeks proteksi antara kelompok vaksinasi dan kelompok = 5.5	Nilai indeks proteksi antara kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak kurang dari 3.0

Tabel 2. Hasil Titer Antibodi Pascavaksinasi Rabies dengan Metode ELISA

No	Kode Sampel	Jenis Hewan	Jenis Kelamin	Nama Hewan	Hasil Uji ELISA BIORAD		Persyaratan Mutu	
					(IU/mL)	Kualitatif	(IU/mL)	Kualitatif
1	1	Anjing	Jantan	Jimbaran	1,700	Positif	≥ 0.500	Positif
2	2	Anjing	Betina	Kuku	1,902	Positif	≥ 0.500	Positif
3	3	Anjing	Jantan	Unyo	3,806	Positif	≥ 0.500	Positif
4	5	Anjing	Betina	Iteung	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
5	6	Anjing	Betina	Unyu	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
6	8	Anjing	Betina	Bonita	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
7	9	Anjing	Jantan	Kute	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
8	10	Anjing	Betina	Unya	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
9	11	Anjing	Jantan	Yoko	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
10	12	Anjing	Betina	Melati	3,385	Positif	≥ 0.500	Positif
11	13	Anjing	Betina	Unyi	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
12	14	Anjing	Jantan	Bonbon	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
13	15	Anjing	Jantan	Canggu	3,064	Positif	≥ 0.500	Positif
14	18	Anjing	Jantan	Adna	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
15	19	Anjing	Jantan	Arjuno	1,384	Positif	≥ 0.500	Positif
16	20	Anjing	Jantan	Bromo	2,266	Positif	≥ 0.500	Positif
17	22	Anjing	Betina	Lala	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
18	23	Anjing	Jantan	Embul	3,736	Positif	≥ 0.500	Positif
19	25	Anjing	Jantan	Enong	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
20	29	Anjing	Betina	Dangdang	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
21	45	Anjing	Jantan	Snopy	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
22	47	Anjing	Betina	Nubi	2,945	Positif	≥ 0.500	Positif
23	48	Anjing	Jantan	Mix	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
24	49	Anjing	Jantan	Scuby	3,113	Positif	≥ 0.500	Positif
25	50	Anjing	Jantan	Mingming	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
26	51	Anjing	Betina	Lexy	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
27	56	Anjing	Betina	Broni	3,377	Positif	≥ 0.500	Positif
28	58	Anjing	Jantan	Ciko	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
29	61	Anjing	Jantan	Beuty	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
30	62	Anjing	Betina	Palde	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
31	65	Anjing	Jantan	Koko	3,274	Positif	≥ 0.500	Positif
32	66	Anjing	Jantan	Monco	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
33	67	Anjing	Jantan	Surya	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
34	68	Anjing	Jantan	Gendon	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
35	69	Anjing	Jantan	Kaka	3,706	Positif	≥ 0.500	Positif

No	Kode Sampel	Jenis Hewan	Jenis Kelamin	Nama Hewan	Hasil Uji ELISA BIORAD		Persyaratan Mutu	
					(IU/mL)	Kualitatif	(IU/mL)	Kualitatif
36	70	Anjing	Jantan	Brangus	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
37	71	Anjing	Jantan	Black	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
38	72	Anjing	Jantan	Tonti	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
39	73	Anjing	Betina	Keke	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
40	74	Anjing	Betina	Beris	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
41	75	Anjing	Jantan	Sapi	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
42	76	Anjing	Jantan	Kendi	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
43	77	Anjing	Jantan	Mozarella	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
44	79	Anjing	Jantan	Boy	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
45	80	Anjing	Jantan	Bebe	3,304	Positif	≥ 0.500	Positif
46	81	Anjing	Jantan	Bibi	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
47	82	Anjing	Betina	Blecky	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
48	83	Anjing	Jantan	Brena	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
49	84	Anjing	Betina	Beno	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
50	85	Anjing	Jantan	Sanur	2,953	Positif	≥ 0.500	Positif
51	86	Anjing	Jantan	Endull	0,865	Positif	≥ 0.500	Positif
52	87	Anjing	Jantan	Kubilai	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif
53	88	Anjing	Jantan	Kopi	>4,000	Positif	≥ 0.500	Positif

Keterangan : IU = International Unit; Negatif = Tidak protektif ; Positif = Protektif

PEMBAHASAN

Uji inaktivasi penting dilakukan pada vaksin inaktif yang mengandung virus patogen yang bersifat zoonotik. Titik kritis pada proses uji inaktivasi vaksin 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 (Natih et al. 2021). Pengujian potensi vaksin rabies pada prinsipnya dilakukan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan vaksin rabies dalam pembentukan kekebalan pada hewan percobaan setelah di tantang dengan virus standar. Vaksin rabies dikatakan baik apabila dapat menimbulkan kekebalan yang cukup pada hewan percobaan setelah ditantang dengan virus rabies dengan mengukur nilai indeks proteksi. Mengacu pada

standar pengujian yang terdapat di Farmakope Obat hewan Indonesia (FOHI) bahwa standar minimal kelulusan vaksin rabies pada hewan percobaan (mencit) apabila nilai indeks proteksi antara kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak kurang dari 3.0.

Mutu vaksin dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain sifat imunogenik strain vaksin, kandungan jumlah mikroorganisme, cara pembuatan vaksin, distribusi dan penyimpanannya. Faktor-faktor tersebut merupakan mata rantai yang memerlukan penanganan dan pengawasan serta pemantauan agar vaksin selalu terjamin mutunya (Natih et al. 2011). Keberhasilan vaksinasi pada hewan atau manusia dapat diuji menggunakan ELISA, metode ini merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mendeteksi antibodi rabies pada serum hewan

(anjing) serta pada serum manusia Titer antibodi ini digunakan untuk mengkonfirmasi respons antibodi setelah dilakukan vaksinasi pada anjing (Santosa et al. 2021).

Antibodi adalah bahan kimia khusus yang mampu mengikat antigen spesifik. Antibodi spesifik dapat diukur menggunakan antigen yang telah ditentukan dan hal ini merupakan dasar dalam berbagai uji biologi diagnostik termasuk ELISA. Hasil dari uji ELISA, diperoleh dari pengukuran absorbansi menggunakan ELISA reader (Santosa et al. 2021). Antibodi puncak respon pada hewan peliharaan secara klasik dilaporkan dalam literatur antara 3 sampai 6 minggu setelah vaksinasi. Pengujian titer antibodi pascavaksinasi rabies harus memperhatikan interval antara vaksinasi dan pengujian titer antibodi. Beberapa faktor lain seperti usia, status reproduksi, dan immunosupresi juga berperan penting (Minke et al. 2009).

Vaksin rabies dianggap protektif terhadap hewan target jika hewan target memiliki antibodi mencapai titer minimal yaitu tidak kurang dari 0.500 IU/ml (WHO 1985). Standar tersebut dapat menimbulkan tingkat kekebalan yang akan berkorelasi dengan kemampuan hewan untuk melindungi diri terhadap infeksi virus rabies. Jika titer anti bodi tidak mencapai atau kurang dari 0.500 IU/ml maka vaksin dianggap tidak mampu untuk memproteksi atau tidak mampu menimbulkan kekebalan pada tubuh hewan target sehingga tidak akan mampu untuk melindungi hewan target dari serangan atau infeksi virus rabies (Sari Sayu et al. 2021). Hasil pengujian serologis yang dilakukan didapatkan hasil bahwa semua sampel yang mewakili 53 individu anjing memiliki titer antibodi ≥ 0.500 IU/ml dengan titer anti bodi tertinggi mencapai ≥ 4.000 IU/ml dan titer anti bodi terendah mencapai 0,865 IU/ml, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa vaksin yang disuntikan

pada hewan target (anjing) yang dijadikan objek pengujian memiliki antibodi yang mampu memberikan proteksi atau dapat melindungi hewan dari infeksi virus rabies.

Metode uji serologis untuk rabies dapat menggunakan metode uji ELISA dan metode Virus Neutralization (VN). Tujuan utama penggunaan metode uji serologi untuk rabies adalah untuk menentukan respons antibodi hewan pascavaksinasi pada hewan domestik dalam rangka pengendalian rabies, kegiatan pemantuan hewan yang berkaitan dengan perjalanan internasional, atau untuk memantau kampanye vaksinasi massal pada anjing dan spesies reservoir satwa liar lainnya. ELISA merupakan uji serologis yang cepat dan efektif karena tidak memerlukan virus rabies yang hidup. Melalui metode ini mampu dideteksi antibodi secara spesifik karena dapat mengikat antigen virus rabies, terutama bagian glikoprotein dan nukleoprotein virus rabies. Metode uji ELISA untuk Rabies dapat juga digunakan untuk memantau keberhasilan vaksinasi rabies pada spesies satwa liar, dan saat ini sudah terdapat kit ELISA komersial yang telah direkomendasikan untuk memantau vaksinasi rabies pada rubah dan *racoon* (Wasniewski et al., 2016) (OIE 2018).

Virus netralisasi pada prinsipnya adalah metode uji yang digunakan untuk mendeteksi jumlah virus homolog dengan antibodi yang ternetralisasi. Metode ini digunakan untuk mengetahui tingkat protektifitas vaksin secara invitro. Titik kritis dalam pengujian virus netralisasi adalah serum berkualitas sangat berpengaruh pada validitas uji, serum yang kualitas buruk dapat menyebabkan sitotoksitas dalam tes VN dan dapat menyebabkan hasil positif palsu. Terdapat korelasi antara uji ELISA dan VN yaitu kedua metode tersebut berkorelasi kuat dalam mendeteksi titer antibodi pasca vaksinasi. Korelasi tersebut sangat tergantung pada jenis

ELISA dan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang bervariasi.

Hingga saat ini, kit ELISA Rabies yang beredar di Indonesia baik jenis ELISA *direct*, ELISA *indirect* atau pun ELISA kompetitif belum ada yang tervalidasi oleh lembaga pemerintah. Secara umum penggunaan kit ELISA Rabies untuk mengukur titer antibodi pascavaksinasi, untuk memantau pergerakan atau perdagangan hewan secara internasional (Wasniewski et al., 2014). Namun upaya memantau pergerakan hewan dari satu daerah ke daerah lain di Indonesia atau untuk keperluan perdagangan internasional belum dapat menggunakan Kit ELISA Rabies karena kit ELISA tersebut belum tervalidasi oleh lembaga pemerintah dan validasi kit ELISA harus dilakukan dengan benar sesuai dengan tujuan penggunaannya (Wasniewski et al., 2016) (OIE 2018).

Upaya pengendalian rabies umumnya dilakukan dengan vaksinasi terhadap anjing peliharaan dan eliminasi pada anjing-anjing liar, selain itu dilakukan juga sosialisasi pada warga tentang penyakit rabies. Upaya pengendalian ini belum berjalan secara optimal hal ini terlihat padapenyakit rabies masih menyebar dengan sangat mudah dan cepat (Adjid et al., 2005). Keberhasilan vaksinasi rabies ditandai dengan adanya antibodi pasca vaksinasi. Banyaknya kendala saat vaksinasi menjadi penyebab kurang optimalnya vaksin yang masuk ke dalam tubuh hewan tersebut sehingga antibodi yang diproduksi kurang maksimal. Hal inilah yang menyebabkan pentingnya untuk mendeteksi level antibodi yang terbentuk pasca vaksinasi untuk melihat tingkat kekebalan individu pasca vaksinasi. Pilihan vaksin dan waktu tes darah adalah faktor penting dalam mencapai tes serologis yang sukses hasil setelah vaksinasi rabies (Minke et al. 2009).

Keberhasilan vaksinasi rabies ditandai dengan tumbuhnya titer antibodi yang bersifat

seropositif ($\geq 0,500$ IU/mL) pasca vaksinasi. Salah satu uji yang dilakukan untuk memonitor pertumbuhan antibodi adalah ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Cahyana et al. 2021). Metode ELISA merupakan salah satu metode yang bersifat kuantitatif untuk deteksi antibodi terhadap virus rabies. Seropositif merupakan keadaan titer antibodi pada darah mampu melindungi dari penyakit rabies dengan jumlah titer antibodi diatas 0,500 IU/mL (WHO, 1985; Prasatya et al., 2018). Tingginya nilai titer antibodi protektif (100%) yang diperoleh menunjukkan bahwa vaksinasi yang diberikan berhasil menimbulkan kekebalan terhadap penyakit rabies.

Menurut WHO (1998), ada banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan vaksinasi, yaitu vaksin yang digunakan yaitu vaksin yang dapat protektif selama 2 tahun atau lebih dengan satu kali vaksinasi; tim vaksinator yang terlatih; pengelolaan komponen sistem rantai dingin yang benar yang meliputi penggunaan pelayanan kesehatan, peralatan untuk penyimpanan dan transportasi vaksin, prosedur pengelolaan program dan kontrol distribusi vaksin. *World Organization for Animal Health (WOAH)* selaku organisasi dunia untuk kesehatan hewan, menyatakan bahwa vaksin yang disuntikan harus memberikan kekebalan protektif setidaknya selama satu tahun dan pengujian potensi vaksin dapat ditetapkan serta dikendalikan dengan menggunakan tes yang diformulasikan oleh farmakope yang diakui oleh masing-masing negara (OIE 2018). Sedangkan *WHO (World Health Organization)* menyatakan bahwa vaksin yang baik adalah vaksin yang dapat protektif atau melindungi target selama dua tahun atau lebih dengan satu kali penyuntikan vaksin (WHO 1998).

Uji potensi vaksin yang dilakukan di laboratorium menggunakan 2 jenis pengujian yaitu uji tantangan dengan menghitung nilai indeks

proteksi dan uji ELISA. Hasil uji tantangan diperoleh nilai indeks proteksi sebesar 5.5, sedangkan nilai minimum kelulusan yaitu sebesar ≥ 3.0 . Vaksin rabies yang diuji pada hewan percobaan di laboratorium yang memiliki nilai potensi sesuai dengan standar kelulusan maka akan mampu memberikan proteksi terhadap hewan-hewan target yang divaksinasi Uji ELISA pada hewan target didapatkan individu hewan target memiliki titer antibodi antara 0,865 IU/ml sampai dengan ≥ 4.000 IU/ml, sedangkan standar titer antibodi minimal adalah tidak kurang dari 0.500 IU/ml. Berdasarkan hal tersebut maka dapat dikatakan bahwa vaksin yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kualitas yang baik karena memiliki nilai yang melebihi standar minimal yang dapat memproteksi atau melindungi hewan target dari infeksi virus rabies karena dapat menimbulkan respon kekebalan dengan terbentuknya anti bodi di dalam tubuh. Selain itu dapat dikatakan pula, jika. Tingginya nilai titer antibodi protektif (100%) yang diperoleh menunjukkan bahwa vaksinasi yang diberikan berhasil.

Menurut (Moreira Beatriz, et.al., 2020) untuk memastikan kualitas dan konsistensi produksi suatu vaksin, beberapa pedoman internasional dan lokal serta monografi telah menetapkan berbagai pengujian yang wajib dilakukan untuk pelepasan suatu vaksin diantaranya adalah uji potensi, uji inaktivasi, uji keamanan dan uji pirogenesitas terhadap hewan percobaan laboratorium. Pengujian vaksin rabies di Indonesia yang mengacu pada Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI), seluruh metode pengujian vaksin rabies dilakukan secara *in vivo* yaitu inokulasi secara langsung pada hewan percobaan dan vaksin rabies harus lulus standar uji potensi, uji keamanan dan uji inaktivasi terhadap hewan percobaan sebelum suatu vaksin dilepaskan atau diedarkan (DitjenPKH 2018).

Kualitas vaksin rabies yang sudah lulus uji oleh BBPMSOH sebagai pemegang otoritas untuk uji mutu dan sertifikasi tidak hanya ditentukan dari hasil uji laboratorium oleh BBPMSOH tetapi juga disebabkan oleh berbagai faktor. Menurut Wulandari et.al., (2021) faktor lain yang sangat berpengaruh terhadap kualitas vaksin adalah sistem "rantai dingin (*Cold Chain*)" dari penyimpanan dan pendistribusian vaksin yang harus selalu dijaga dalam kondisi baik. Sistem rantai dingin ini terdiri dari serangkaian hubungan mulai dari penyimpanan dan pengangkutan, sampai dengan pendistribusian yang semuanya dirancang untuk menjaga vaksin pada suhu yang benar sehingga mencapai penerima. Rantai dingin tersebut setidaknya memiliki tiga faktor yang akan mempengaruhi kualitas vaksin yaitu penyimpanan dan transportasi vaksin pada saat pendistribusian, petugas yang bertanggung jawab terhadap penanganan vaksin serta petugas vaksinator yang terlatih dan standar operasional prosedur yang efisien. Rantai dingin ini mengharuskan suhu penyimpanan tetap terjaga pada kisaran 2-8°C mulai dari refrigerator di pabrik pembuatan vaksin kemudian dibawa ke tingkat distributor dan ketempat-tempat penyedia vaksin sampai dengan vaksin diberikan atau disuntikan ke hewan target.

KESIMPULAN

Vaksin rabies yang bermutu dan waktu pengujian serum pascavaksinasi adalah faktor penting dalam keberhasilan uji serologis (Minke et al. 2009). Vaksin rabies WRD-0012021 mempunyai mutu yang baik, yaitu vaksin terinaktivasi sempurna dan memiliki indeks protektif lebih dari 3.0. Hasil uji serum pascavaksinasi menunjukkan tingginya nilai titer antibodi protektif yaitu ≥ 0.500 IU/ml pada 100% hewan target, hal ini menunjukkan bahwa

vaksinasi rabies yang diberikan pada hewan target menimbulkan kekebalan terhadap rabies.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu tulisan ini terutama kepada Rainbow Sanctuary Indonesia, Dinas Perikanan dan Peternakan Kabupaten Bogor dan tim *World Rabies Day 2021* Balai Besar pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

DAFTAR PUSTAKA

- Cahyana IPAT, Pharmawati M, Narayani I 2021. Deteksi Level Antibodi Pada Serum Darah Anjing Kintamani Pasca Vaksinasi Rabies Dengan Direct ELISA. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences* 8(1): 172-177.
- [DitjenPKH]. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI). Jilid 1. Edisi 5. Kementerian Pertanian.
- [DitjenPKH]. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2019. Masterplan Nasional Pemberantasan Rabies di Indonesia. Kementerian Pertanian.
- Fooks AR, Cliquet F, Finke S, Freuling C, Hemachudha T, Mani RS, Thomas Müller T, Nadin-Davis S, Picard-Meyer E, Wilde H and Banyard ZC. 2017. Rabies. *Nature Reviews* Vol 3.
- Natih KKN, Yupiana Y, Hermawan D, Nuryani N, Djusa ER. 2011. Kualitas vaksin rabies yang beredar di Indonesia. *Buletin Penyakit Zoonosis* 11: 23-24.
- Natih KKN, Hidayanto NK, Ardiawan F, Hermawan D. Kajian mutu vaksin rabies Tahun 2011-2020. *Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan* 30: 39-50.
- Madhusudana SN, Briggs D, Bourhy H. 2011. *Recent Advances in Prevention and Control of Rabies. Advances in Preventive Medicine*.
- Minke JM, Bouvet J, Cliquet F, Wasniewski M, Guiot AL, Lemaitre L, Cariou C, V. Cozette V, L. Vergne L, Guigal PM. 2009. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Veterinary Microbiology* 133 (2009) 283–286.
- [OIE]. Office International des Epizooties. 2018. Rabies (infection with rabies virus and other lyssavirus). Chapter 3.1.17. (578 – 608).
- Prasatya, I.G.M.A., I. B. K. Suardana, dan I.N. Suartha. 2018. Respons Imun Anjing Lokal Jantan Umur Diatas Satu Tahun Pasca Vaksinasi Rabies. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(1): 69-75.
- Sari Sayu RP.W.S., Mahardika, I.G.N.K., & Tenaya I, W.M. (2021). Deteksi antibodi terhadap rabies pada anjing lepasan berdasarkan topografi wilayah di kabupaten Badung, Bali. *Jurnal Veteriner*, Vol. 22 No. 3: 398-405.
- Santoso K, Herowati UK, Rotinsulu DA, Murtini S, Ridwan MY, Hikman DW, Abdul Zahid A, Wicaksono A, Nugraha AB, Afiff U, Wijaya A, Arif R, Tarigan R, Sukmawinata E. 2021. Perbandingan deteksi titer antibodi pascavaksinasi rabies berbasis kolorimetri menggunakan ELISA reader dan kamera telepon genggam. *Jurnal Veteriner* Vol. 22 No. 1: 79-85.
- [WHO]. World Health Organization. 1998. Global programmed for vaccine and immunization, WHO/EPILHIS/89.02. 7-8.
- [WHO]. World Health Organization. 1985. World Health Organization expert committee on biological standards. Thirty-fifth report. World Health Organisation Technical Report Series No. 725. WHO, Geneva, Switzerland.

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

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

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

*email: novida_07@yahoo.co.id

ABSTRAK

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

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

ABSTRACT

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

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

PENDAHULUAN

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

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

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

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

MATERI DAN METODE

Materi dan Alat

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

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

Metode

Pembuatan buffer 4

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

Pembuatan medium 8

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

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

Persiapan standar uji potensi dan deret standar

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

Persiapan sampel uji

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

Tahap Pengujian

Uji Potensi antibiotik

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

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

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

Keterangan:

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

Uji Presisi

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

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

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

Uji Akurasi

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

yaitu berada antara 90 – 107 %.

Uji Linearitas

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

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

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

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

Nilai LOQ didapat dengan menggunakan rumus:

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

Spesifisitas

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

perbedaan diameter standar dan sampel pada konsentrasi yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Presisi

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

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

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

Tabel 1 Hasil Uji potensi spektinomisin serbuk

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

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

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

Akurasi

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

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

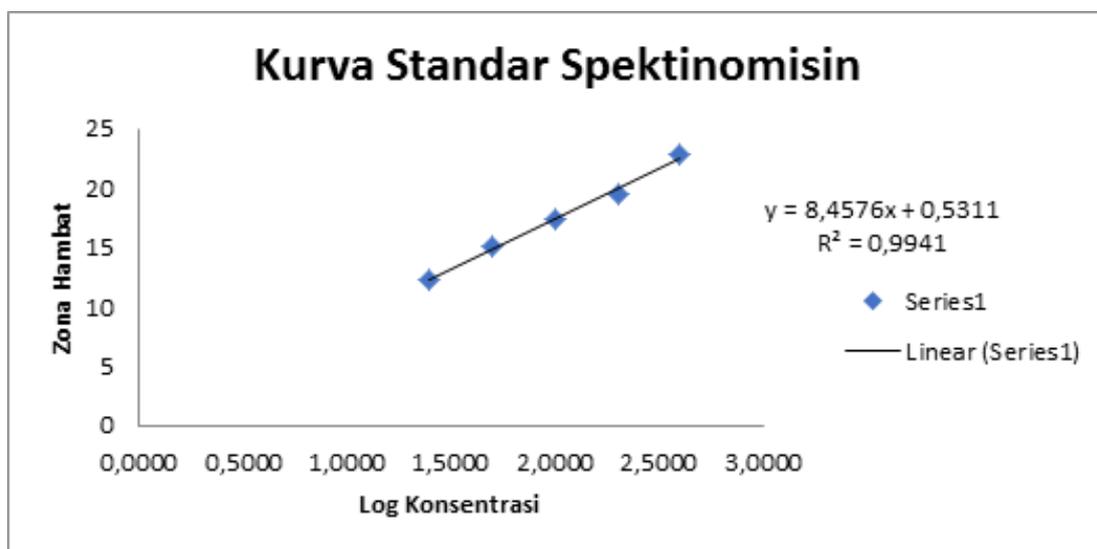
Linearitas

Uji linearitas terhadap standar spektinomisin

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

Tabel 3 Hasil perolehan kembali standar spektinomisin

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



Gambar 1. Kurva linearitas standar spektinomisin

Tabel 4 Hasil zone hambat kurva standar spektinomisin

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

Tabel 5 Hasil log konsentrasi kurva standar dan zone hambat terkoreksi

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

Tabel 6 Data perhitungan nilai LOD dan LOQ spektinomisin

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

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

Spesifisitas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KESIMPULAN

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

DAFTAR PUSTAKA

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

KAJIAN RESPON IMUN AYAM PETELUR PASCAVAKSINASI AVIAN INFLUENZA (AI) DI DELAPAN PROVINSI DI INDONESIA TAHUN 2022

Ramlah, Nur Khusni Hidayanto, Sri Suryanti, Yati Suryati

Unit Uji Virologi

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

Email: ramlahfg@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit *Avian Influenza* (AI) disebabkan oleh virus influenza tipe A, diantaranya adalah virus AI subtipe H5, merupakan salah satu yang paling diwaspadai karena kemampuannya dalam menimbulkan wabah pada hewan maupun manusia (*zoonosis*). Tujuan kajian ini untuk menganalisis status kekebalan pascavaksinasi AI pada ayam petelur di delapan provinsi di Indonesia, yaitu Sumatera Selatan, Banten, Jawa tengah, Bali, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung dan Kalimantan Barat. Sampel sebanyak 550 serum disampling dari peternakan ayam petelur pascavaksinasi AI tiga sampai enam minggu. Riwayat vaksinasi peternakan ayam petelur diperoleh dari data kuesioner. Sampel serum di uji *Haemagglutination Inhibition (HI)* terhadap antigen AI subtipe H5N1 strain A/Chicken/Semarang/04141225-07/2014 (*Clade 2.3.2*) dan antigen AI subtipe H9N2 strain A/chicken/Sidrap/07170094-440/2017. Hasil menunjukkan vaksinasi AI dengan titer protektif 70 % terhadap AI subtipe H5N1 yaitu Provinsi Banten, Jawa Tengah, Bali, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung dan Kalimantan Barat. Vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan titer antibodi positif terhadap virus AI subtipe H9N2 yaitu yang dilaksanakan di Provinsi Banten, Jawa Tengah, Bali, Jawa Barat, dan Sumatera Utara.

Kata Kunci: *Avian Influenza, uji Haemagglutination Inhibition, AI Subtipe H5N1, AI Subtipe H9N2*

ABSTRACT

Avian Influenza (AI) disease is caused by type A influenza viruses, including the AI subtype H5 virus, which is one of the most alert because of its ability to cause epidemics in animals and humans (zoonosis). The purpose of this study was to analyze post-vaccination AI immune status in laying in eight provinces in Indonesia, namely South Sumatra, Banten, Central Java, Bali, West Java, North Sumatra, Lampung and West Kalimantan. A sample of 550 sera was obtained from laying hens after three to six weeks of AI vaccination. Vaccination history of laying was gained from questionnaire data. Serum samples were tested for Haemagglutination Inhibition (HI) against AI antigen subtype H5N1 strain A/Chicken/Semarang/04141225-07/2014 (Clade 2.3.2) and AI antigen subtype H9N2 strain A/chicken/Sidrap/07170094-440/2017. The results showed AI vaccination with a protective titer of 70% against AI subtype H5N1, namely the Provinces of Banten, Central Java, Bali, West Java, North Sumatra, Lampung and West Kalimantan. AI vaccinations that have resulted in positive antibody titres against AI virus subtype H9N2 were carried out in the provinces of Banten, Central Java, Bali, West Java and North Sumatra.

Keywords: *Avian Influenza, Haemagglutination Inhibition test, AI Subtype H5N1, AI Subtype H9N2*

PENDAHULUAN

Penyakit *Avian Influenza* (AI) disebabkan oleh virus influenza tipe A yang dibagi menjadi beberapa subtipe berdasarkan kombinasi glikoprotein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Terdapat 16 jenis HA dan sembilan jenis NA yang diidentifikasi pada unggas (OIE 2021). Berdasarkan patogenitasnya virus AI dibedakan menjadi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi dan sering menimbulkan wabah dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) menyebabkan gejala ringan atau tidak memiliki gejala pada unggas yang terinfeksi (Alexander, 2000; Harimoto and Kawaoka, 2001). Virus AI yang sangat patogenik sampai saat ini ditimbulkan oleh subtipe H5 dan H7 (Wasito *et al.*, 2014).

Virus AI subtipe H5 merupakan salah satu yang paling diwaspadai karena kemampuannya dalam menimbulkan wabah pada hewan maupun manusia (*zoonosis*). Kejadian penyakit AI subtipe H5N1 yang terjadi di berbagai negara telah menimbulkan kerugian pada industri perunggasan karena menyebabkan kematian unggas yang sangat tinggi (mencapai 90%) dan kerugian ekonomi bagi peternak. Penyakit ini merupakan penyakit eksotik yang termasuk dalam *list A Office International des Epizootic* (OIE) dan harus dilaporkan, penyebarannya sangat cepat dan menyebar hampir keseluruhan negara (OIE 2021). Penyakit AI subtipe H5N1 yang mewabah dan endemik di Indonesia sejak 2003 telah menyebabkan kerugian ekonomi dan korban jiwa manusia yang signifikan (Hartawan dan Dharmayanti 2012). Virus AI subtipe H5N1 pada tahun 2014 hingga tahun 2019 yang berhasil diisolasi di *live bird market* (LBM), di beberapa provinsi di Indonesia adalah kelompok *Clade* 2.1.3.2 dan *Clade* 2.3.2.1, serta beberapa telah mengalami *reassortment*

dari kedua *Clade* tersebut (Dharmayanti *et al.* 2020).

Salah satu subtipe virus LPAI adalah H9N2 (Bano *et al.*, 2003). Virus *Avian Influenza* subtipe H9N2 telah menjadi perhatian bagi kesehatan unggas dalam 20 tahun terakhir (Pusch dan Suarez, 2018). Virus AI subtipe H9N2 menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri perunggasan (Thuy *et al.*, 2016). Mayoritas ayam yang terinfeksi virus AI subtipe H9N2 menunjukkan gangguan pernapasan dan penurunan produksi telur (Kim, 2018). Virus AI subtipe H9N2 muncul pada unggas domestik pada pertengahan tahun 1990-an (Fusaro *et al.*, 2011). Pada akhir tahun 2016 dilaporkan terjadinya kasus penurunan produksi telur pada peternakan ayam petelur di beberapa provinsi di Indonesia yang disebabkan oleh virus AI subtipe H9N2 (Natih *et al.*, 2020) Virus AI subtipe H9N2 telah menyebar di berbagai provinsi di Indonesia diantaranya Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Jawa Timur dan Bali (Jonas *et al.*, 2018). Berdasarkan sifat *zoonosis* dan besarnya dampak kerugian ekonomi yang ditimbulkan, maka pada Keputusan Menteri Pertanian Nomor 4026/Kpts/OT.140/3/2013 penyakit AI ditetapkan sebagai salah satu Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) prioritas.

Salah satu tugas pokok dan fungsi BBPMSOH yang diamanatkan melalui Keputusan Menteri Pertanian Nomor 53/Permentan/OT.140/5/2013 tentang Organisasi dan Tata Kerja Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan adalah melakukan pengkajian obat hewan dalam rangka pengawasan konsistensi mutu obat hewan yang telah diregistrasi yang beredar di Indonesia. Kegiatan yang mendukung pengkajian obat hewan maka dilakukan pengujian terhadap serum pascavaksinasi AI di beberapa provinsi di Indonesia. Tujuannya untuk menganalisis

status kekebalan pascavaksinasi AI pada ayam petelur di delapan provinsi di Indonesia, yaitu Sumatera Selatan, Banten, Jawa tengah, Bali, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung dan Kalimantan Barat.

MATERI DAN METODE

MATERI

Materi Sampling

Bahan dan alat pada saat pengambilan sampel diantaranya *cooler box*, *ice packs*, *thermometer*, spuit 3 ml, kapas alkohol, tabung 1.8 ml, kotak serum, alat pelindung diri (APD), *marker*, label dan parafilm.

Materi Pengujian

Bahan dan alat uji hambatan aglutinasi yaitu antigen AI subtipe H5N1 (strain A/Chicken/Semarang/04141225-07/2014 (Clade 2.3.2) dan AI subtipe H9N2 A/chicken/Sidrap/07170094-440/2017 (Pusvetma), serum positif AI, serum negatif AI, sampel serum hasil vaksinasi, *Phosphate Buffer Saline/PBS* (Gibco), *Red Blood Cell* (RBC) 1 %, larutan *Alsever*, alkohol 70%, iodin, *microplate 96 well V-bottom* (Nunc), *multichannel* 10-100 μ l, *single channel* 25-100 μ l, *tips* 10-200 μ l, *pipet aids*, *pipet measure* 1, ml, 10 ml, 20 ml, *Biosafety Cabinet* (BSC) tipe 2A, *shaker*, *sentrifus*, *reservoir*, *chamber*, masker, sarung tangan, dan *baker* plastik volume 2 l (*autoclavable*).

METODE

Metode Sampling

Pemilihan lokasi ditentukan berdasarkan peta kasus penyakit AI (iSIKHNAS, 2021) dan populasi ternak pada tahun 2021 (BPS, 2021). Besaran sampel serum tiap provinsi ditentukan dari populasi dan *prevalensi* yang diperoleh dari pengkajian tahun 2020 sebesar 80% dengan tingkat kepercayaan 90%, *presisi* 10% dan *recovery rate* 10%. Sampel serum ayam petelur pascavaksinasi AI diambil dari delapan provinsi di Indonesia, terdiri dari Sumatera Selatan, Banten, Jawa Tengah, Bali, Jawa Barat,

Sumatera Utara, Lampung dan Kalimantan Barat (Tabel 1). Sampel darah diambil melalui vena *brachialis*

Metode Pengujian

Tahapan pengujian *Haemagglutination (HA)* dan *Haemagglutination Inhibitor (HI)* sesuai dengan metode standar (OIE 2021).

Uji Haemagglutination (HA)

Larutan PBS dimasukkan ke dalam 12 sumur *microplate* sebanyak 25 μ l kemudian ditambahkan 25 μ l suspensi antigen ke dalam sumur pertama *microplate* dan dihomogenasi sebanyak 10 kali, kemudian dilakukan pengenceran kelipatan dua dengan volume 25 μ l dari sumuran ke-1 sampai sumuran ke-11 dan buang sisa cairan tersebut. Larutan PBS ditambahkan kembali sebanyak 25 μ l pada sumur ke-1 sampai 12, kemudian ditambahkan 25 μ l RBC 1% ke dalam 12 sumur. Selanjutnya dihomogenasi menggunakan *microplate shaker* dan diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan dengan cara memiringkan *microplate* 45° agar terlihat ada tidaknya aliran RBC. Titer HA ditentukan dari pengenceran tertinggi dimana memberikan komplit haemagglutinasi. Antigen dianggap positif jika sel darah merah terjadi aglutinasi.

Uji Back Titration

Larutan PBS dimasukkan ke dalam 7 sumur *microplate* sebanyak 25 μ l kemudian ditambahkan 25 μ l suspensi antigen ke dalam sumur pertama dan kedua *microplate* dan sumur kedua dihomogenasi sebanyak 10 kali. Pengenceran kelipatan dua dengan volume 25 μ l dari sumuran ke-2 sampai sumuran ke-6 dan buang sisa cairan tersebut. Larutan PBS ditambahkan kembali sebanyak 25 μ l pada sumur ke-2 sampai ke-7, kemudian ditambahkan 25 μ l RBC 1% ke dalam 7 sumur. Pengujian dilakukan tiga kali (*triplo*) pengulangan pada sumur *microplate*. Selanjutnya dihomogenasi menggunakan *microplate shaker* dan diinkubasi

selama 40 menit pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan dengan cara memiringkan *microplate* 45° agar terlihat ada tidaknya aliran RBC. Titer HA ditentukan dari pengenceran tertinggi dimana memberikan komplit haemagglutinas. Antigen dianggap positif jika sel darah merah terjadi aglutinasi.

Uji Haemagglutination Inhibitor (HI)

Larutan PBS 25 µl dimasukkan pada setiap sumur *microplate*, kemudian ditambahkan dengan 25 µl setiap sampel serum ke dalam setiap sumuran pertama dan dilakukan pengenceran seri hingga sumur terakhir. Antigen AI 4 HAU ditambahkan sebanyak 25 µl pada setiap sumur. Setelah itu *microplate* dihomogenasi menggunakan *microplate shaker*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Sebanyak 25 µl RBC 1% ditambahkan ke dalam setiap sumur. *Microplate* kemudian *dishaker* dan diinkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang. Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC. Titer antibodi dibawah 2⁴

atau 16 HI unit diinterpretasikan sebagai hasil negatif sedangkan titer $\geq 2^4$ dihitung sebagai hasil positif (OIE 2021).

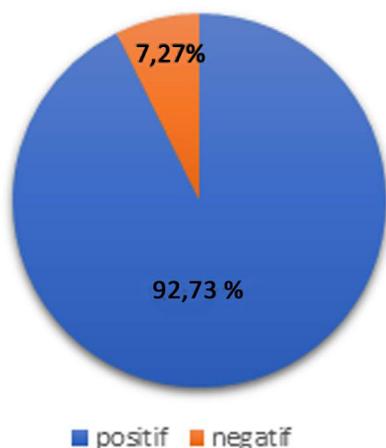
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel serum pascavaksinasi AI H5N1 dan H9N2 sebanyak 550 berasal dari ayam petelur dengan umur 19 sampai dengan 25 minggu. Sampel serum berasal dari peternakan dari delapan provinsi di Indonesia. Sampel serum diambil dari ayam petelur yang telah divaksinasi AI minimal tiga sampai dengan enam minggu. Sampel serum diuji dengan uji hambatan aglutinasi untuk mengukur titer antibodi terhadap virus AI (OIE, 2021). Antigen yang digunakan yaitu antigen AI subtipe H5N1 dan antigen AI subtipe H9N2. Titer antibodi terhadap AI subtipe H5N1 dinyatakan positif jika mempunyai titer minimal 16 (Ditjennak 2007; OIE 2021). Titer antibodi terhadap AI subtipe H9N2 dinyatakan positif jika mempunyai titer minimal 128 (≥ 128) dan mampu mengurangi *shedding* virus AI (Ditjennak, 2018; OIE 2021).

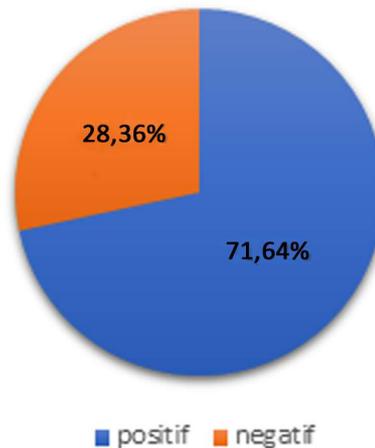
Tabel 1 Data Lokasi dan Besaran Sampel Serum Pascavaksinasi AI

No	Provinsi	Kabupaten/Kota	Jumlah sampel
1	Sumatera Selatan	Banyuasin	50
2	Banten	Tangerang	50
3	Jawa Tengah	Sukoharjo	100
4	Bali	Bangli	50
5	Jawa Barat	Cianjur	100
6	Sumatera Utara	Binjai	100
7	Lampung	Pringsewu	50
8	Kalimantan Barat	Singkawang Selatan	50
Total			550

Titer Antibodi AI Subtipe H5N1



Titer Antibodi AI Subtipe H9N2



Gambar 1 Titer Antibodi AI Subtipe H5N1 dan Titer Antibodi Subtipe H9N2

Hasil pengujian titer antibodi terhadap antigen AI subtipe H5N1 strain A/Chicken/Semarang/04141225-07/2014 (Clade 2.3.2) dari 550 sampel menunjukkan, sebanyak 510 serum (92,73%) positif memiliki antibodi AI diatas 16 (≥ 16) dan 40 serum (7,27%) menunjukkan hasil yang negatif. Selain itu, hasil pengujian titer antibodi terhadap antigen AI subtipe H9N2 strain dari 550 sampel menunjukkan sebanyak 394 serum (71,64%) positif diatas 128 (≥ 128) dan 156 serum (28,36%) menunjukkan hasil yang negatif (Gambar 1 dan Tabel 2).

Pada Tabel 2 dapat dilihat titer antibodi pascavaksinasi AI berdasarkan pengujian titer antibodi terhadap virus AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2. Vaksinasi AI dinyatakan protektif terhadap flock apabila lebih dari 70% mempunyai titer lebih besar dari 16 (> 16)⁽⁸⁾. Vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan titer antibodi positif terhadap virus AI H5N1 lebih dari 70% pada flock yaitu yang dilaksanakan di Provinsi Banten, Jawa Tengah, Bali, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung dan Kalimantan Barat. Sedangkan di Provinsi Sumatera Selatan diperoleh presentase titer antibodi sebesar 52%. Vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan titer antibodi positif terhadap virus AI H9N2 yaitu yang dilaksanakan

di Provinsi Banten, Jawa Tengah, Bali, Jawa Barat, dan Sumatera Utara. Sedangkan di Provinsi Sumatera Selatan, dan Lampung diperoleh presentase titer antibodi sebesar 62% dan 22%. Pada Provinsi Kalimantan Barat sampel serum tidak memiliki titer antibodi terhadap H9N2 dikarenakan kandungan vaksin yang digunakan tidak mengandung AI Subtipe H9N2.

Berdasarkan data kuesioner dari peternakan ayam petelur di provinsi tersebut diantaranya vaksinasi AI pada ayam petelur dilakukan sebanyak 1 kali hingga 3 kali selama periode pemeliharaan. Pelaksanaan vaksinasi AI dilakukan oleh *technical services* dari distributor vaksin AI, dan beberapa juga dilakukan oleh pegawai dari peternakan tersebut. Pelaksanaan kebersihan kandang meliputi pengambilan kotoran ayam yang dilakukan rata-rata 1 kali seminggu bahkan masih ada yang dilakukan 2 kali dalam setahun, pembersihan kandang telah menggunakan desinfektan, namun pencucian alat makan ayam layer masih ada yang menggunakan air kran.

Keberhasilan program vaksinasi dapat dipengaruhi berbagai faktor diantaranya tata laksana vaksinasi diantaranya, tata laksana

peternakan serta pelaksanaan biosekuriti lingkungan yang memadai. Kegagalan suatu vaksinasi dapat disebabkan karena program vaksinasi yang tidak sesuai dengan usia, putus rantai dingin pada penanganan dan penyimpanan vaksin, aplikasi vaksin yang tidak *lege artis*, tingkat stres yang tinggi pada unggas, manajemen kandang yang buruk, kualitas vaksin yang buruk, jenis *serotipe* vaksin yang tidak sesuai dengan virus yang bersirkulasi di lapangan dan keberadaan antibodi asal induk (Motjaba *et al.*, 2012; Swayne *et al.*, 2015).

Negara yang terinfeksi endemik AI, disarankan tetap melakukan surveilans virus

AI dan seromonitoring, dan pelaksanaan biosekuriti, untuk mengidentifikasi dan mengurangi kegagalan vaksinasi AI (Capua dan Alexander, 2004; OIE, 2019). Identifikasi secara serologi adalah suatu cara surveilans untuk mengetahui pola penyebaran penyakit AI di lapangan (Kusumastuti *et al.*, 2015). Penyebaran virus dalam suatu daerah dapat dilakukan dengan cara surveilans keterpaparan virus pada hewan dan secara alami keterpaparan virus pada hewan akan merangsang respon kekebalan humoral dalam tubuh yang membentuk antibodi (Darmawi *et al.*, 2012).

Tabel 2 Data Hasil Titer Antibodi AI Subtipe H5N1 dan Titer Antibodi AI Subtipe H9N2

No	Provinsi	Strain Vaksin	Jumlah sampel	Titer Antibodi AI H5N1			Titer Antibodi AI H9N2	
				<16 (Negatif)	16 - <32 (Positif)	≥32 (Protektif)	<128 (Negatif)	≥128 (Positif)
1	Sumatera Selatan	H5N1+H9N2	50	17 (34%)	7 (14%)	26 (52%)	19 (38%)	31 (62%)
2	Banten	H5N1+H9N2	50	0 (0%)	1 (2%)	49 (98%)	9 (18%)	41 (82%)
3	Jawa Tengah	H5N1+H9N2	100	0 (0%)	2 (2%)	98 (98%)	15 (15%)	85 (85%)
4	Bali	H5N1+H9N2	50	1 (2%)	4 (8%)	45 (90%)	2 (4%)	48 (96%)
5	Jawa Barat	H5N1+H9N2	100	0 (0%)	11 (11%)	89 (89%)	1 (1%)	99 (99%)
6	Sumatera Utara	H5N1+H9N2	100	13 (13%)	17 (17%)	70 (70%)	21 (21%)	79 (79%)
7	Lampung	H5N1+H9N2	50	2 (4%)	5 (10%)	43 (86%)	39 (78%)	11 (22%)
8	Kalbar	H5N1	50	7 (14%)	2 (4%)	41 (82%)	50 (100%)	0 (0%)
TOTAL			550	40/550 (7,27%)	49/550 (8,91%)	461/550 (83,82%)	156/550 (28,36%)	394/550 (71,64%)

KESIMPULAN

Hasil pengujian sampel serum ayam petelur pascavaksinasi AI dari delapan provinsi diperoleh gambaran bahwa vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan titer antibodi positif terhadap virus AI subtipe H5N1 dengan nilai persentase 70% yaitu yang dilaksanakan di Provinsi Banten, Jawa Tengah, Bali, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung dan Kalimantan

Barat, sedangkan vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan titer antibodi positif terhadap virus AI subtipe H9N2 yaitu yang dilaksanakan di Provinsi Banten, Jawa Tengah, Bali, Jawa Barat, dan Sumatera Utara.

SARAN

Peningkatkan tingkat keberhasilan program vaksinasi perlu dilakukan evaluasi pelaksanaan

vaksinasi AI di lapangan antara lain aplikasi vaksin, penerapan rantai dingin dan sumber daya manusia. Monitoring pascavaksinasi perlu peran aktif dinas agar sampel yang diuji mewakili kondisi nyata di lapangan melalui pasif servis (pelayanan Kiriman Daerah/KD). Perlu diberikan *booster* vaksin AI subtipe H5N1 dan H9N2, lebih dari 2x dalam satu periode pemeliharaan ayam layer dan perlu dilakukan *booster* pada ayam yang lebih dari 30-40 minggu. Pelaksanaan vaksinasi ayam layer juga diberikan vitamin untuk mengurangi tingkat stres ayam. Peternakan dan produsen vaksin perlu melakukan pengecekan titer antibodi secara periodik untuk menentukan waktu yang tepat untuk melakukan *booster* vaksin AI selama periode pemeliharaan

DAFTAR PUSATAKA

- Alexander DJ. 2000. A Review of Avian influenza in Defferent Bird Species. *Vet. Microbiol.* 74: 3-13.
- Bano SK, Naemm SA, Mail. 2003. Evaluation Evaluation of pathogenic potential of Avian Influenza virus serotype H9N2 in chickens. *Avian Dis* 47: 817-822.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. Terdapat pada <https://www.bps.go.id/indicator/24/477/1/populasi-ayam-ras-petelur-menurut-provinsi.html>. [diunduh pada 05 Januari 2021]
- Capua I, Alexander DJ. 2004. Avian influenza: Recent developments. *Avian Pathol.* 33(4):393-404. doi:10.1080/03079450410001724085.
- Darmawi, Manaf ZH, Darniati, Fakhurrazi, Abrar M, Erina. 2012. Deteksi Antibodi Serum Terhadap Virus Avian influenza pada Ayam Buras. *Agripet* 12 (1): 23-27.
- Dharmayanti NLPI, Hewajuli DA, Ratnawati A. 2020. Genetic Diversity Of The H5N1 Viruses In Live Bird Markets , Indonesia. 21(4):1-13. *J Vet Sci.* 2020 Jul;21(4):e56 <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e56>
- [Ditjennak]. Direktorat Jenderal Peternakan. 2007. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 3.
- [Ditjennak]. Direktorat Jenderal Peternakan. 2008. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 18/Permentan/OT.140/5/2008. Tentang Pedoman Penataan Kompartemen dan Penataan Zona Usaha Perunggasan. [Ditjennak]. Direktorat Jenderal Peternakan. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 5.
- Fusaro A, Monne I, Salviato A, Valastro V, Schivo A, Amarin NM, Gonzales C, Ismail MM, Al-Ankari A, Al-Blowi MH, Khan OA, Ali ASM, Hedayati A, Garcia JG, Ziay GM, Shouahtari A, Al-Qahtani KN, Capua I, Holmes EC, Cattoli G. 2011. Phylogeography and Evolutionary History of Reassortant H9N2 Viruses with Potential Human Health Implications. *Journal Of Virology* 85(16): 8413-8421.
- Harimoto T and Kawaoka Y. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- Hartawan R. dan Dharmayanti NLPI. 2014. Sirkulasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 di Pasar Tradisional di Jawa Timur Tahun 2012. *Berita Biologi* 13(1).
- [iSIKHNAS] Sistem Informasi Kesehatan Hewan nasional. Terdapat pada <https://www.isikhnas.com/id>. [diunduh pada 05 Januari 2021].
- Jonas M, Sahestia A, Murwijatia T, Lestariningsiha CL, Irinea I, Ayesdaa CS, Prihartinia W, Mahardika GN. 2018. Identifikasi avian influenza virus subtype H9N2 in chicken farms in Indonesia. *Preventive Veterinary Medicine* 159: 99-105
- Kim SH. 2018. Challenge for One Health: CoCirculation of Zoonotic H5N1 and H9N2 Avian Influenza Viruses in Egypt. *Viruses* 10:121. doi: 10.3390/v10030121.
- Kusumastuti A, Syamsidar, Paderi AZ, Nurhandayani A, Kencana GAY. 2015. Identifikasi Secara Serologi Galur Virus Flu Burung Subtipe H5N1 *Clade* 2.1.3 dan *Clade* 2.3.2 pada Ayam Layer. *Jurnal Veteriner.* 16 (3) : 371-382.
- Mojtaba Y, Gary D Butcher AN, Miles RD, Ali R. 2012. The Culprits Of Vaccination Failures. *World Poultry - Elsevier.* 2 (18) :8.
- Natih KKN, Hidayanto NK, Setiawaty R, Suryati Y. 2020. Buletin Pengujian Obat Hewan-BBPM SOH. No.29. ISSN : 0852-9612.
- [OIE] Office International Des Epizooties/ World Organization for Animal Health. 2019. Infection With Avian Influenza. Chapter 10.4
- [OIE] Office International Des Epizooties/ World Organization for Animal Health. 2021. OIE Terrestrial Manual. Avian Influenza. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf

- Pusch EA, Suarez DL. 2018. Review: The Multifaceted Zoonotic Risk of H9N2 Avian Influenza. *Vet Sci* 5: 82.
- Thuy DM, Peacock TP, Bich VTN, Fabrizio T, Hoang DN, Tho ND, Diep NT, Nguyen M, Hoa LNM, Trang HTT, Choisy M, Inui K, Newman S, Trung NV, Doorn RV, To TL, Iqbal M, Bryant JE. 2016. Prevalence and diversity of H9N2 avian influenza in chickens of Northern Vietnam. *Infect of Northern Evol.* 44: 530–540. Doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.038.
- Swayne DE, Suarez DL, Spackman E, Jadhao S, Dauphin G, Kim-Torchetti M, McGrane J, Weaver J, Daniels P, Wong F, et al. 2015. Antibody Titer Has Positive Predictive Value for Vaccine Protection against Challenge with Natural Antigenic-Drift Variants of H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Viruses from Indonesia. *J Virol.* 89 (7) : 3746–3762. doi:10.1128/jvi.00025-15
- Wasito R, Wuryastuti H, Tjahyowati G, Irianingsih SH, Tyasasmaya T. 2014. Detection and Differentiation of Pathogenic H5 and H7 Influenza A Virus Subtypes in Indonesia Poultry by Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Net. J.* 2: 27-31.

PENGAJIAN MUTU ANTIBIOTIK GOLONGAN KUINOLON TAHUN 2023

*Siti Khomariyah, Maria Fatima Palupi, Rosana Anita Sari, Emi Rusmiati, Nafisah Indrishanty, Fika Asti Fanani, Ambarwati, Novida Ariyani, Nurhidayah, Indriyana, Anna Miftahul Jannah

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

*email: drhsitikhomariyah@gmail.com

ABSTRAK

Antibiotik golongan kuinolon merupakan antibiotik spektrum luas untuk menangani berbagai kasus infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram positif dan negatif, termasuk *Mycobacteria* dan bakteri anaerob. Pengkajian mutu antibiotik golongan kuinolon bertujuan untuk mendapatkan data mutu antibiotik kuinolon baik dari produsen dalam negeri maupun produk impor yang beredar di Indonesia. Pengambilan sampel dilakukan di *poultry shop*, depo obat hewan, distributor obat hewan di sembilan provinsi dan 40 sampel di tujuh perusahaan importir obat hewan di Indonesia. Sembilan provinsi tersebut diantaranya Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung, Banten, Sumatera Selatan, Kalimantan Selatan, dan Riau. Perusahaan importir obat hewan yang diambil berada di provinsi Daerah Khusus Ibukota (DKI) Jakarta, Banten, dan Jawa Barat. Jumlah jenis zat aktif yang diperoleh dari 236 sampel adalah tujuh zat aktif dari golongan kuinolon diantaranya enrofloksasin, siprofloksasin, flumequin, marbofloksasin, norfloksasin, dan ofloksasin. Sampel – sampel tersebut terdiri dari bentuk serbuk, kapsul, tablet, cair untuk oral dan cair untuk injeksi. Dari 236 sampel, didapatkan 228 sampel mengandung zat aktif tunggal dan 8 sampel mengandung zat aktif kombinasi siprofloksasin dan tilosin. Pengujian mutu obat hewan meliputi uji fisik dan uji khusus. Uji fisik dilakukan dengan melihat keseragaman warna dan ada tidaknya partikel asing. Uji khusus terdiri dari uji identitas dan uji kadar kuinolon dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Adapun untuk sediaan injeksi dilakukan uji tambahan meliputi uji sterilitas dan uji toksisitas abnormal. Uji mutu untuk identifikasi zat aktif tilosin dilakukan dengan menggunakan kromatografi kinerja cair tinggi (KCKT) dan uji potensi dilakukan menggunakan metode hayati. Berdasarkan hasil pengujian mutu dari total sampel sebanyak 236 diperoleh hasil sebanyak 228 sampel memenuhi persyaratan mutu obat hewan dan delapan sampel tidak memenuhi syarat pada uji kadar. Kegiatan pengawasan obat hewan harus terus ditingkatkan guna mencegah terjadinya penyalahgunaan dalam hal pembuatan, penyediaan, penyimpanan, peredaran maupun dalam pemakaian obat hewan yang berdampak pada bahaya resistensi antibiotik. Sehingga perlu adanya penatagunaan antimikroba yang bijak dan bertanggung jawab serta meningkatkan pemahaman, kepedulian dan kesadaran terkait resistensi antimikroba.

Kata Kunci : Antibiotik, Kuinolon, Mutu, Obat

ABSTRACT

Quinolone antibiotics is a broad-spectrum antibiotic to treat various cases of infections caused by Gram positive and negative bacteria, including Mycobacteria and anaerobic bacteria. This study aims is to obtain data related to the quality of quinolone antibiotics from both domestic producers and imported products that circulating in Indonesia. Sampling was carried out at poultry shops, veterinary drugs depots, veterinary drug distributors in nine provinces and 40 samples at seven veterinary drug importing companies in Indonesia. The nine provinces include East Java, Central Java, West Java, North Sumatra, Lampung, Banten, South Sumatra, South Kalimantan and Riau. The importing companies for the veterinary drugs taken were in Special Capital City Region (DKI) of Jakarta, Banten and West Java. A total of 236 antibiotic samples obtained consisted of seven active substances from the quinolone group including enrofloxacin, ciprofloxacin, flumequine, marbofloxacin, norfloxacin and ofloxacin. These samples consist of powder, capsule, tablet, liquid for oral and liquid for injection. Of the 236 samples, 228 samples contained a single active substance and 8 samples contained a combination of ciprofloxacin and tylosin. Testing the quality of veterinary drugs includes physical tests and special tests. The Physical test is carried out by looking at the color uniformity and the presence or absence of foreign particles. Specific tests consist of an identity test and content test using UV-Vis spectrophotometer. For injection preparations, additional tests are carried out including sterility tests and abnormal toxicity tests. The quality test for identification of the active substance tylosin was carried out using high performance liquid chromatography and the potency test was carried out using the bioassay method. Based on the results of quality testing, out of a total of 236 samples, 228 samples met the quality requirements for veterinary drugs and eight samples did not meet the assay requirements. Veterinary drug control activities must be continuously improved in order to prevent misuse in terms of manufacture, supply, storage, distribution and use of veterinary drugs which have an impact on the dangers of antibiotic resistance. So, there is a need for wise and responsible stewardship of antimicrobials as well as increasing understanding, concern and awareness regarding antimicrobial resistance.

Keywords: Antibiotics, quinolones, Quality, Drugs

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik tidak dapat lepas dari dunia kesehatan hewan khususnya di peternakan unggas. Antibiotik digunakan untuk beberapa tujuan dalam peternakan broiler, diantaranya *flushing* antibiotik di masa awal kehidupan ayam usia sehari (*Day Old Chick/DOC*), pengobatan akibat infeksi bakterial, dan pencegahan akan adanya infeksi bakteri serta sebagai pemicu pertumbuhan (*growth promoters*). Adapun penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan di Indonesia sudah dilarang efektif sejak 01 Januari 2018. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Efendi dkk (2022), antibiotik yang sering digunakan dalam peternakan broiler adalah golongan penisilin (33,3%) dan golongan kuinolon (33,3%). Kuinolon merupakan golongan antibiotik spektrum luas untuk menangani berbagai kasus infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram positif dan negatif, termasuk *Mycobacteria* dan bakteri anaerob. Pemberian kuinolon dapat menghambat sintesa asam nukleat bakteri dengan cara mengganggu enzim topoisomerase IV dan girase *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), serta memecah kromosom bakteri (Pham dkk., 2019).

Kuinolon dibagi menjadi empat generasi. Generasi pertama merupakan generasi yang tidak memiliki atom fluorin dalam gugus kimianya, diantaranya asam nalidiksik, asam oksolinik dan flumekuin. Generasi kedua memiliki atom fluorin dalam gugus kimianya yang dapat meningkatkan aktifitas antimikroba melawan bakteri Gram negatif dan beberapa Gram positif. Generasi kedua diantaranya siprofloksasin, norfloksasin, enrofloksasin, danofloksasin, difloksasin, marbofloksasin, ofloksasin, orbifloksasin dan sarafloksasin (OIE, 2021). Generasi kuinolon ketiga memiliki aktifitas antimikroba yang lebih luas untuk melawan bakteri Gram positif dan negatif, diantaranya

levofloksasin, sparfloksasin, greprafloksasin, klinafloksasin, dan gatifloksasin. Generasi keempat memiliki aktifitas antimikroba untuk melawan bakteri Gram positif dan negatif serta menghambat bakteri anaerob (Kergaravat dkk., 2021). Generasi ke empat diantaranya moxifloksasin, gemifloksasin, trovafloksasin, dan garenoxasin (Pham dkk., 2019). Kuinolon yang sering digunakan di lingkungan kedokteran hewan diantaranya flumekuin, amifloksasin, benofloksasin, siprofloksasin, danofloksasin, difloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin, norfloksasin/ norfloksasin nikotinat, ofloksasin, orbifloksasin, dan sarafloksasin. Enrofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon yang pertama kali dikenalkan di dunia kedokteran hewan (Sarkozy, 2001).

Obat-obat yang dipakai di lingkungan Kedokteran Hewan juga sebagian dipakai untuk pengobatan di manusia. Beberapa obat dari golongan kuinolon tersebut diantaranya *siprofloksasin, norfloksasin, ofloksasin dan levofloksasin* (BPOM, 2023). Penggunaan kuinolon secara luas, baik di bidang kesehatan manusia maupun di bidang kedokteran hewan, telah menyebabkan peningkatan resistensi terhadap kuinolon sehingga kuinolon tidak efektif lagi dalam mengobati infeksi. Sebagai contoh, siprofloksasin merupakan obat yang banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit akibat bakteri Gram negatif dan Gram positif pada infeksi saluran pernapasan, infeksi saluran urinasi, dan beberapa penyakit intestinal. Penggunaan rutin di klinik manusia dan terkadang penggunaan yang tidak bijak atau berlebihan di peternakan, telah menyebabkan munculnya resistensi terhadap kuinolon pada bakteri (Millanao, dkk., 2021).

Pada tahun 2021, Indeks Obat Hewan Indonesia (IOHI) Edisi XIII mencatat delapan jenis golongan kuinolon dengan 159 nama produk dalam zat aktif tunggal ataupun

campuran telah mendapat nomor registrasi untuk beredar di Indonesia. Dalam rangka menjamin keamanan dan mutu obat hewan yang beredar di Indonesia, pemerintah melalui Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 jo Undang-Undang Nomor 41 Tahun 2014 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan menyatakan bahwa setiap obat hewan yang beredar di Indonesia harus memiliki nomor registrasi. Nomor registrasi tersebut digunakan untuk memudahkan pengawasan semua obat hewan yang beredar di wilayah Republik Indonesia. Pengawasan terhadap pembuatan, penyediaan, peredaran serta pemakaian obat hewan merupakan kewenangan Pemerintah Pusat dan kewenangan Provinsi sebagai Daerah Otonom yang tercantum dalam Peraturan Pemerintah Nomor 25 Tahun 2000. Salah satu aspek penting dalam penyediaan dan penggunaan obat hewan adalah mutu obat hewan. Dalam ketentuan umum pasal 1 Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 695/Kpts/TN.260/8/96, pengujian mutu adalah proses kegiatan untuk menilai khasiat dan keamanan sediaan obat hewan.

Pengkajian mutu antibiotik golongan kuinolon bertujuan untuk mendapatkan data mutu antibiotik kuinolon baik dari produsen dalam negeri maupun produk impor yang beredar di Indonesia. Data tersebut diharapkan dapat bermanfaat dalam rangka penjaminan obat hewan yang berkualitas di dunia Kesehatan Hewan.

MATERI DAN METODE

Materi

Pengambilan sampel di lapangan dan pengujian dilakukan di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) pada bulan Februari - April 2023. Total sebanyak 236 sampel antibiotik golongan kuinolon telah diambil di dua kategori penyedia obat hewan yaitu 196 sampel di *poultry shop*, depo,

distributor obat hewan di sembilan provinsi dan 40 sampel di tujuh perusahaan importir obat hewan di Indonesia. Sembilan provinsi tersebut diantaranya Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung, Banten, Sumatera Selatan, Kalimantan Selatan dan Riau. Perusahaan importir obat hewan yang diambil berada di DKI Jakarta, Banten dan Jawa Barat. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara membeli sampel antibiotik tersebut dengan ketentuan dalam satu merek dagang diambil empat sampel yang memiliki nomor bets yang sama sehingga dalam satu merek dagang memiliki empat kode sampel.

Sebanyak 228 sampel yang didapatkan merupakan sampel sediaan tunggal yang mengandung zat aktif enrofloksasin, siprofloksasin, flumekuin, marbofloksasin, norfloksasin, dan ofloksasin. Sedangkan delapan sampel lain merupakan antibiotik sediaan campuran yang mengandung zat aktif siprofloksasin dan tilosin. Uji yang dilakukan adalah uji fisik, identitas, kadar/potensi, sedangkan untuk sediaan injeksi ditambahkan uji sterilitas dan toksisitas abnormal. Pengujian sebagian besar dilakukan di unit uji Farmasetik dan Premiks. Adapun uji sterilitas dilakukan di Unit Uji Bakteriologi dan uji toksisitas abnormal dilakukan di Unit Uji Hewan Percobaan.

Bahan yang dibutuhkan untuk uji identitas dan kadar kuinolon diantaranya *distilled water* (DW), Natrium Hidroksida (Emsure®, Supelco by Merck, Jerman), standar enrofloksasin (Sigma-Aldrich, Israel), standar siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Jerman), standar flumekuin (Sigma-Aldrich, Jerman), standar marbofloksasin (Sigma-Aldrich, Jerman), standar norfloksasin (Sigma-Aldrich, Jerman), dan standar ofloksasin (*raw material*). Bahan untuk uji identitas tilosin diantaranya standar tilosin tartrat (Sigma-Aldrich, China), asetonitril *gradient grade for liquid chromatography* (LiChrosolv®, Merck,

Jerman), DW. Pengujian potensi tilosin membutuhkan beberapa bahan diantaranya standar tilosin (Sigma-Aldrich, China), Buffer No.4 (13,3 g monopotassium fosfat (Emsure®, Supelco by Merck, Jerman), 6,2 g potassium hidroksida (Emsure®, Merck, Jerman) dalam 1 L aquadest, pH 8,0), Media No. 8 (6,0 g pepton (Difco, Perancis), 1,5 g *beef extract* (Difco, Perancis), 3 g *yeast extract* (Gibco, USA), 1 g D(+) glukosa (Merck, Perancis), 15 g agar (Difco, Perancis) dalam 1 L aquadest, pH 8,0) dan biakan kuman *M. luteus* 9341 8%.

Peralatan yang dibutuhkan untuk pengujian mutu antibiotik kuinolon antara lain 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). Peralatan yang dibutuhkan dalam uji identitas tilosin diantaranya 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, *filter syringe* untuk injeksi sampel dan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Waters 2487, Amerika). Uji potensi tilosin membutuhkan peralatan diantaranya 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, mikropipet ukuran 1000 µL, cawan petri, *silinder cup*, jangka sorong dan inkubator 37°C (Hirasawa, Jepang).

Khusus sampel antibiotik golongan kuinolon injeksi yang larut air dilakukan uji toksisitas

abnormal. Peralatan yang dibutuhkan diantaranya tabung reaksi, gelas beaker, pipet volumetrik 1-10 ml, vortex, bunsen, pematik api, *bulb*, *needle*, *syringe* kaca 1 ml, kapas dan *alcohol* 70%. Bahan yang dibutuhkan diantaranya sampel antibiotik golongan kuinolon injeksi yang larut air, NaCl fisiologis steril dan mencit dengan berat 18-22 gram sebanyak 10 ekor. Adapun untuk uji sterilitas mengacu pada uji sterilitas pada Suplemen Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Edisi 4 Sediaan Farmasetik dan Premiks Tahun 2022.

Metode

Pengujian mutu sampel antibiotik golongan kuinolon yang dilakukan terdiri dari uji fisik (uji warna dan uji ada tidaknya partikel asing) dan uji khusus (uji identitas dan kadar). Berdasarkan Suplemen FOHI Edisi IV tahun 2022, uji fisik dilakukan secara visual membandingkan isi sediaan dari betas yang sama dan diamati warna, homogenitas sediaan dan keberadaan partikel asing.. Uji keberadaan partikel asing dilakukan untuk sampel sediaan cair saja dengan melihat ada tidaknya kontaminasi dalam sampel tersebut. Beberapa metode pengujian yang digunakan dalam pengujian identitas dan kadar sampel antibiotik golongan kuinolon diantaranya enrofloksasin dan siprofloksasin menggunakan Suplemen FOHI Edisi IV tahun 2022, norfloksasin menggunakan FOHI Edisi IV tahun 2009, sedangkan flumequin, marbofloksasin dan ofloksasin menggunakan instruksi kerja pengujian (IKP) Farmasetik dan Premiks No. 767.

Pengujian mutu sampel antibiotik golongan kuinolon diawali dengan menyiapkan pelarut NaOH 0,1 N, penimbangan standar antibiotik berbagai kuinolon yang diperlukan dan penimbangan sampel. Pembuatan pelarut NaOH 0,1 N dilakukan dengan cara menimbang empat gram pellet NaOH untuk dimasukkan

ke dalam labu takar 1000 ml dan dilarutkan menggunakan 100 ml DW . Setelah larut, ditambahkan DW sampai tanda batas kemudian dihomogenkan. NaOH 0,1 N yang telah dibuat selanjutnya di simpan dalam wadah yang tertutup rapat dan terhindar dari sinar matahari langsung.

Standar antibiotik berbagai kuinolon yang diperlukan ditimbang secara seksama masing-masing sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL NaOH 0,1 N. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan DW sampai didapatkan konsentrasi akhir 5 µg/mL. Sampel ditimbang setara dengan 100 mg dan dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan DW sampai didapatkan konsentrasi akhir 5 µg/ml. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan pada rentang panjang gelombang ultraviolet antara 200-340nm. 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. Uji kadar dinyatakan memenuhi syarat, apabila kadar kuinolon berada dalam rentang 90-110% dari zat aktif yang dinyatakan di komposisi pada kemasan.

Uji identitas tilosin dilakukan menggunakan IKP Farmasetik dan Premiks No. 825. Uji identitas tilosin diawali dengan membuat fase gerak, penimbangan standar tilosin dan penimbangan sampel. Pembuatan fase gerak dilakukan dengan cara mencampurkan 90 bagian asetonitril dicampurkan dengan 10 bagian DW. Standar tilosin ditimbang secara seksama sebanyak 10,0 mg dan dilarutkan menggunakan fase gerak. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan fase

gerak sampai didapatkan konsentrasi akhir 10 µg/ml. Sebelum diinjeksikan ke KCKT, standar tilosin disaring menggunakan filter 0,45 µm. Sampel ditimbang setara dengan minimal 50 mg tilosin dan dilarutkan dengan 50 ml fase gerak. . Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan fase gerak sampai didapatkan konsentrasi akhir 10 µg/ml. Sebelum diinjeksikan ke KCKT, standar tilosin disaring menggunakan filter 0,45 µm. Kondisi kromatografi yang harus disiapkan dalam pengujian identitas tilosin diantaranya kolom yang digunakan C18 dengan panjang 250 mm dan diameter dalam 4 mm, detektor UV 292 nm, dan laju alir 1,5 ml/menit. Uji identitas dinyatakan positif apabila waktu tambat sampel sama dengan waktu tambat standar.

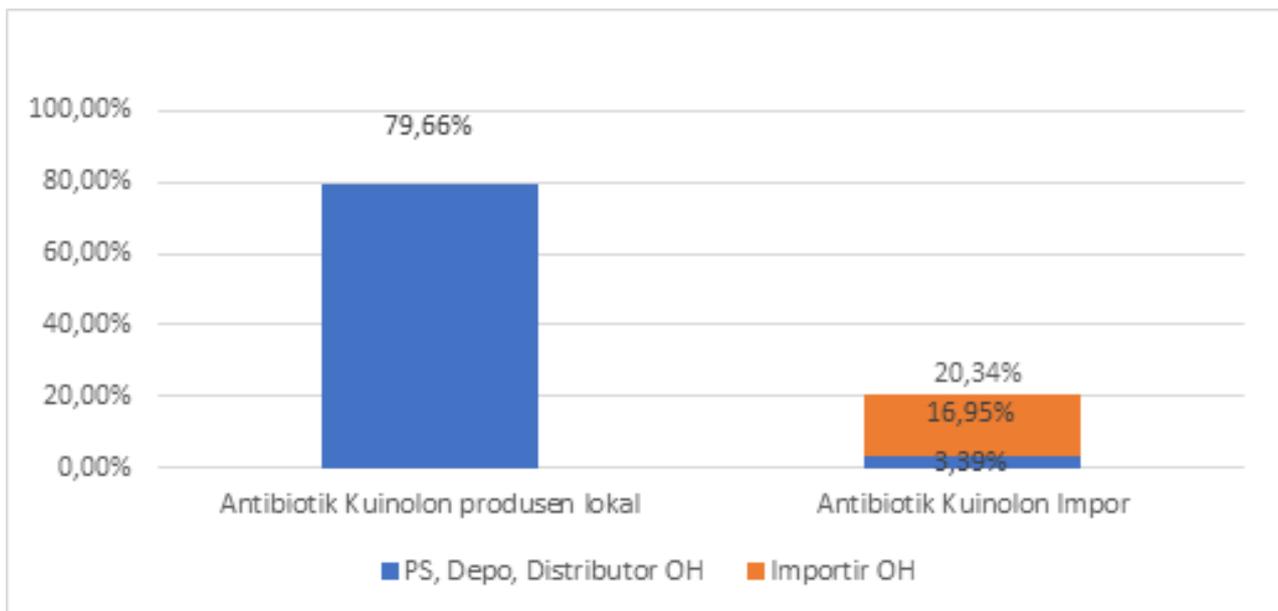
Uji potensi tilosin dilakukan menggunakan metode hayati yang mengacu ke FOHI Edisi IV tahun 2009. Pengujian diawali dengan membuat buffer 4 sebagai pelarut dan media no 8. Sebelum digunakan media no 8 tersebut harus disterilisasi dalam autoclave 121°C selama 15 menit. Timbang dengan seksama standar dan sampel tilosin kemudian dilarutkan dengan Buffer No.4 dihomogenkan dengan bantuan magnetik stirer. Lakukan pengenceran dengan Buffer No.4 hingga diperoleh konsentrasi tinggi 10 µg/ml dan konsentrasi rendah 2,5 µg/ml. Masukkan standar dan sampel menggunakan mikropipet sebanyak 280 µL ke dalam silinder cup pada cawan petri dan inkubasi pada suhu $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 10-18 jam. Ukur diameter daerah hambat dan hitung potensi tilosin dengan rumus Log P. Uji potensi dinyatakan memenuhi syarat, jika potensi tilosin berada dalam rentang 95-105% dari zat aktif yang dinyatakan di komposisi pada kemasan.

Metode pengujian toksisitas abnormal mengacu pada IKP Farmasetik dan Premiks T3. NaCl fisiologis steril dibuat dengan cara menimbang 9 gram NaCl yang dilarutkan

dalam DW hingga 1000 ml, kemudian dilakukan autoclave 121°C selama 15 menit. Sampel dilarutkan dan diencerkan menggunakan NaCl fisiologis hingga diperoleh dosis injeksi yang sesuai dengan dosis per gram berat badan mencit sesuai dengan dosis tunggal pemberian yang direkomendasikan dalam label kemasan. Volume ineksi per mencit tidak boleh melebihi 0,5 ml/ ekor. Injeksi sampel yang telah diencerkan ke vena caudal mencit dalam waktu 8-12 detik per ekor atau secara subkutan. Penyuntikan dilakukan pada 5 ekor mencit perlakuan, 5 ekor mencit yang lain sebagai kontrol. Pengamatan kondisi mencit dilakukan tiap 1 jam, 3 jam, 24 jam dan 48 jam pasca penyuntikan. Selain diamati, semua mencit juga ditimbang dan dicatat berat badannya. Penetapan toksisitas abnormal obat injeksi larut air dinyatakan tidak toksik apabila tidak ada seekor mecit yang mati dalam waktu 48 jam pada kelompok perlakuan dan kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 196 sampel antibiotik golongan kuinolon telah diambil di *poultry shop*, depo, distributor obat hewan di sembilan provinsi di Indonesia. Selain itu, dilakukan juga pengambilan sampel antibiotik golongan kuinolon sebanyak 40 sampel di importir obat hewan. Jumlah sampel yang diperoleh dalam pengkajian antibiotik kuinolon tahun 2023 mengalami peningkatan apabila dibandingkan dengan pengkajian pada tahun 2022. Hasil pengkajian yang dilaporkan oleh Sari dkk (2022) menyebutkan bahwa sampel yang diperoleh sebanyak 188 sampel. Peningkatan terjadi dari tahun 2022 ke 2023 sebesar 25,53%. Hal tersebut dapat terjadi karena pengambilan sampel pada tahun 2022 hanya dilakukan di *poultry shop*, depo, distributor obat hewan di delapan provinsi, sedangkan pada tahun 2023 pengambilan sampel dilakukan di *poultry shop*, depo, distributor obat hewan di sembilan provinsi dan di beberapa importir obat hewan di DKI Jakarta, Banten dan Jawa Barat.



Gambar 1. Presentase antibiotik golongan kuinolon yang diperoleh berdasarkan asal produksi dan lokasi pengambilan sampel

Gambar 1 menunjukkan presentase antibiotik golongan kuinolon yang diperoleh berdasarkan asal produksi dan lokasi pengambilan sampel. Dari total keseluruhan 236 sampel terdiri dari 79,66% (188 sampel) antibiotik golongan kuinolon yang diproduksi oleh perusahaan obat hewan dalam negeri (produsen lokal) dan 20,34% (48 sampel) antibiotik golongan kuinolon impor. Dari 20,34% sampel impor tersebut, sebesar 3,39% diperoleh dari distributor obat hewan dan 16,95% diambil langsung ke importir obat hewan.

Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa penggunaan antibiotik golongan kuinolon dari produsen lokal masih mendominasi pasar obat hewan di sembilan provinsi di Indonesia. Adanya ketersediaan antibiotik golongan kuinolon dari produsen lokal di *poultry shop*, depo dan distributor obat hewan menunjukkan adanya permintaan pasar terhadap antibiotik dari produsen lokal tersebut. Harga yang lebih murah menjadi alasan dalam pemilihan produk lokal dibanding produk impor dalam rangka menekan biaya produksi dalam pemeliharaan unggas di peternakan di Indonesia. Menurut Amam (2022), biaya produksi meliputi suplai DOC sebesar 22,92%, suplai pakan sebesar 74,54% dan biaya OVK (obat, vaksin, kimia) yang digunakan sebesar 2,54 % dalam satu kali periode beternak ayam broiler. Selain pertimbangan harga, produk lokal yang telah memiliki nomor registrasi untuk ijin beredar di Indonesia merupakan salah satu bukti bahwa kualitas obat yang dihasilkan telah memenuhi persyaratan mutu obat hewan.

Sektor perunggasan merupakan sasaran pasar terbesar untuk perusahaan obat hewan di Indonesia. Pemakaian obat hewan dalam industri perunggasan dilakukan guna mendukung pemeliharaan unggas untuk mendapatkan hasil produksi yang optimal. Jumlah perusahaan obat hewan di Indonesia

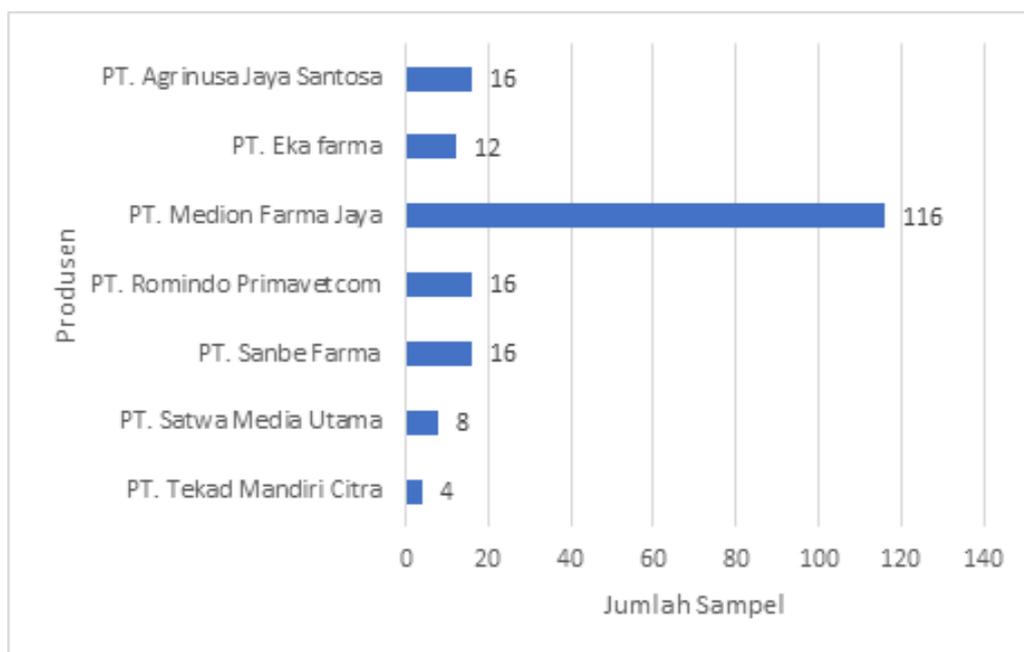
semakin berkembang seiring dengan perkembangan industri peternakan, khususnya pada industri perunggasan. Data Asosiasi Obat Hewan Indonesia (ASOHI) dalam Kusuma (2023) menyebutkan jumlah perusahaan obat hewan yang terdaftar di Kementerian Pertanian mengalami peningkatan dari tahun sebelumnya yaitu produsen obat hewan sebanyak 114 perusahaan, importir sebanyak 280 perusahaan, dan eksportir sebanyak 48 perusahaan.

Gambar 2 menunjukkan jumlah sampel antibiotik golongan kuinolon dari produsen obat hewan lokal yang diperoleh di sembilan provinsi di Indonesia tahun 2023. Sebanyak 116 sampel antibiotik golongan kuinolon yang diperoleh di *poultry shop*, depo, distributor obat hewan di dominasi dengan produk dari PT Medion Farma Jaya. Hal serupa terjadi pada pengkajian tahun 2022 yakni PT Medion Farma Jaya juga mendominasi sebesar 53,19 % perolehan sampel antibiotik kuinolon di delapan provinsi (Sari dkk., 2022). Sari dkk (2022) menyebutkan ada delapan produsen obat hewan lokal yang produknya dijadikan sampel antibiotik kuinolon tahun 2022. Beberapa produsen obat hewan lokal yang produknya diambil sebagai sampel pengkajian tahun 2022 dan 2023 diantaranya PT. Medion Farma Jaya, PT. Agrinusa Jaya Santosa, PT. Sanbe Farma dan PT. Romindo Primavetcom.

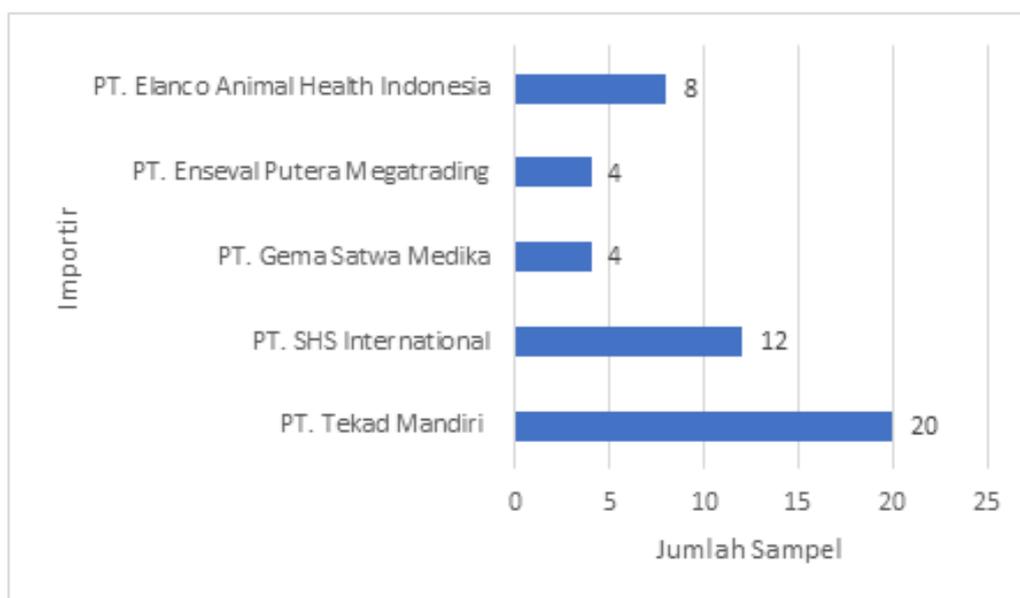
Gambar 4 menunjukkan presentase sampel antibiotik golongan kuinolon yang diperoleh berdasarkan zat aktifnya. Dari 236 sampel antibiotik yang diperoleh didapatkan tujuh zat aktif jenis dari golongan kuinolon diantaranya enrofloksasin, siprofloksasin, flumekuin, marbofloksasin, norfloksasin dan ofloksasin. Selain siprofloksasin dalam bentuk antibiotik tunggal, didapatkan juga dalam bentuk kombinasi dengan tilosin. Enrofloksasin merupakan antibiotik yang paling banyak

didapatkan dalam pengkajian tahun 2023 sebesar 67,80%. Hal tersebut disebabkan karena sediaan enrofloksasin yang beredar dan memiliki nomor registrasi di pasaran paling banyak jumlahnya bila dibandingkan antibiotik kuinolon yang lain. Dalam IOHI (2021) menyatakan jumlah sediaan enrofloksasin sebanyak 74 merek dagang dari 159 merek

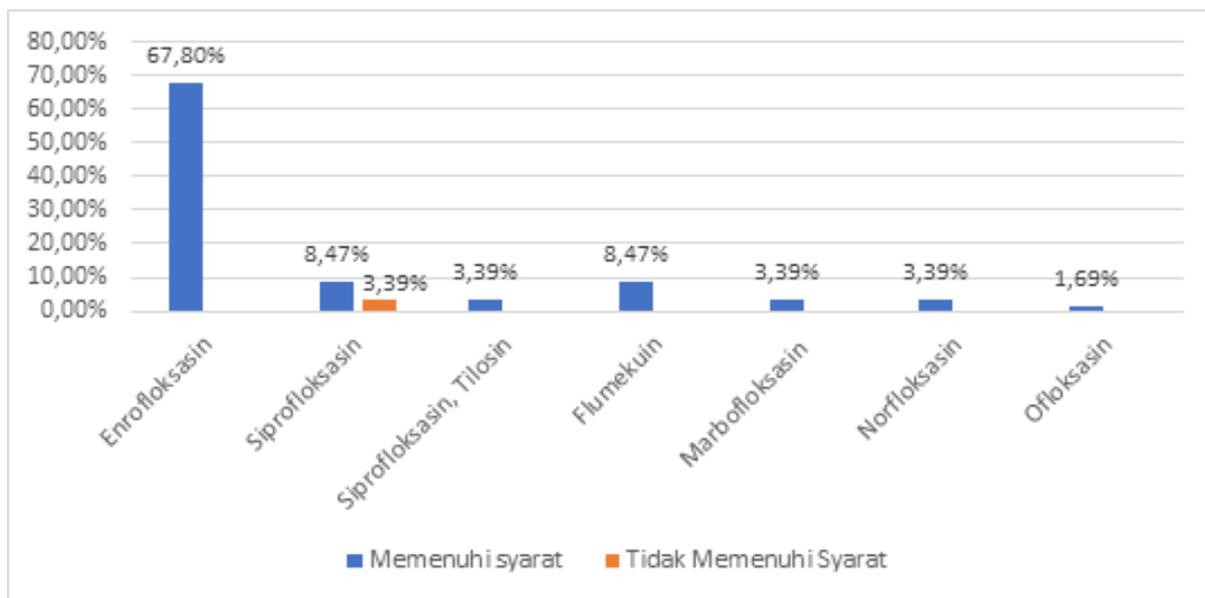
dagang antibiotik kuinolon yang telah memiliki nomor registrasi. Apabila dibandingkan dengan pengkajian tahun 2022, zat aktif dari golongan kuinolon yang diperoleh tahun 2023 lebih bervariasi. Pada tahun 2022, zat aktif yang diperoleh hanya enrofloksasin, siprofloksasin dan flumequin, serta adanya kombinasi antara tilosin dan siprofloksasin (Sari dkk., 2022).



Gambar 2. Jumlah sampel antibiotik golongan kuinolon dari produsen lokal yang diperoleh di sembilan provinsi di Indonesia tahun 2023



Gambar 3. Jumlah sampel antibiotik golongan kuinolon yang diperoleh dari importir di Indonesia tahun 2023



Gambar 4. Presentase sampel antibiotik golongan kuinolon yang diperoleh berdasarkan zat aktifnya tahun 2023

Selanjutnya, 236 sampel antibiotik golongan kuinolon yang diperoleh dilakukan pengujian mutu. Yuda dan Sueno (2016) menyatakan bahwa mutu obat adalah semua unsur yang berpengaruh secara langsung atau tidak langsung terhadap keamanan, keefektifan dan derajat diterimanya suatu produk obat yang akan menentukan efek terapeutik yang dihasilkan. Salah satu aspek yang dapat ditinjau dalam rangka penentuan mutu obat yaitu stabilitas fisik dan kimia.

Stabilitas fisik yang dilakukan di BBPMSOH yaitu melalui uji fisik yang dilakukan secara visual dengan membandingkan isi sediaan dari betas yang sama dan diamati warna, homogenitas sediaan dan keberadaan partikel asing. Adanya perubahan warna menunjukkan adanya ketidakstabilan selama penyimpanan obat yang 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 (Peace dkk., 2012). Khusus untuk sampel antibiotik golongan kuinolon

sediaan cair dilakukan uji partikel asing yaitu dengan melihat ada tidaknya benda asing / kontaminasi. Hasil uji warna dan partikel asing dari 236 sampel antibiotik golongan kuinolon dinyatakan memenuhi syarat. Uji warna dinyatakan memenuhi syarat apabila semua sediaan dalam betas yang sama menunjukkan warna yang seragam, harus homogen dan tidak mengandung partikel asing.

Stabilitas kimia yang dilakukan di BBPMSOH meliputi uji identitas dan kadar. Uji identitas antibiotik golongan kuinolon dilakukan dengan cara membandingkan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan oleh larutan standar dan larutan sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum merupakan suatu kondisi dimana pada panjang gelombang tersebut menghasilkan nilai absorbansi tinggi dan stabil pada rentang serapan 0,2 sampai 0,8. Gandjar dan Rohman (2012) menyebutkan bahwa panjang gelombang yang tidak maksimum akan menyebabkan absorbansi sampel menjadi tidak akurat sehingga sensitivitas

pengukuran juga akan ikut berkurang. Dari hasil pengujian, panjang gelombang maksimum yang diperoleh untuk enrofloksasin 270 ± 1 nm, siprofloksasin 272 ± 1 nm, flumekuin 248 ± 1 nm, marbofloksasin 290 ± 1 nm, norfloksasin 272 ± 1 nm dan ofloksasin 288 ± 1 nm. Hasil uji identitas menunjukkan semua sampel antibiotik golongan kuinolon yang diambil di sembilan provinsi tersebut mengandung zat aktif yang sesuai dengan larutan standar yang digunakan.

Uji identitas juga dilakukan untuk sediaan campuran pada delapan sampel yaitu campuran antara siprofloksasin dan tilosin. Uji identitas untuk tilosin dilakukan menggunakan KCKT dengan membandingkan waktu tambat larutan standar dan sampel. Waktu tambat merupakan waktu yang diperlukan oleh zat aktif tertentu mulai dari waktu injeksi sampel ke KCKT sampai menghasilkan puncak kromatogram dari zat aktif tersebut. Waktu tambat yang dihasilkan oleh tilosin sekitar menit ke 2,6. Hasil uji identitas menunjukkan delapan sampel sediaan campuran dengan tilosin yang diambil mengandung zat aktif yang sesuai dengan larutan standar yang digunakan.

Uji kadar dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan mengukur nilai absorbansi yang dihasilkan pada panjang gelombang maksimum dari sampel antibiotik golongan kuinolon dengan blanko menggunakan air. Persyaratan kadar untuk antibiotik golongan kuinolon yaitu mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% (DJPKH 2022). Hasil uji kadar dari 236 sampel antibiotik golongan kuinolon, didapatkan delapan sampel (3,39%) yang mengandung siprofloksasin sediaan tunggal tidak memenuhi persyaratan karena kadar yang didapat kurang dari 90,0 %. Rahadjo (2005) dalam Rahayu dkk (2009) menyebutkan kadar suatu obat dalam bentuk sediaan akan menunjukkan banyaknya obat yang akan terabsorpsi dalam tubuh dan

menimbulkan efek terapi.

Delapan sampel sediaan campuran siprofloksasin dan tilosin juga dilakukan pengujian. Pengujian tilosin dilakukan dengan menggunakan uji potensi. Prinsip penetapan potensi antibiotik dalam sediaan obat adalah membandingkan dosis larutan sediaan uji terhadap dosis larutan baku pembanding yang menghasilkan derajat hambatan yang sama pada mikroorganisme uji (Radji, 2010). Uji potensi dilakukan tilosin dilakukan menggunakan metode hayati yang mengacu ke FOHI Edisi IV tahun 2009. Adapun untuk uji yang dilakukan dengan metode hayati, dalam hal ini sampel yang mengandung tilosin, syarat kelulusan potensi adalah 95-105% (DJPKH, 2022). Hasil uji potensi dari delapan sampel campuran yang mengandung tilosin dinyatakan memenuhi persyaratan.

Selain uji yang telah disebutkan, uji toksisitas abnormal dilakukan pada sampel antibiotik golongan kuinolon sediaan injeksi yang larut air. Empat sampel dari 16 sampel antibiotik golongan kuinolon sediaan injeksi dilakukan uji toksisitas abnormal sebagai perwakilan sampel injeksi. Pengujian toksisitas dilakukan untuk menganalisis dan mengetahui efek toksik yang ditimbulkan suatu bahan dan juga untuk mengamati gejala keracunan yang dapat menyebabkan kematian pada hewan uji. Pengujian toksisitas dengan menggunakan hewan percobaan diperlukan dan dipersyaratkan dalam berbagai aturan yang berkaitan dengan penilaian keamanan untuk penggunaan obat, bahan kimia, bahan pangan, dan perangkat medis baru (Ayun dkk., 2021). Uji toksisitas abnormal pada sampel kuinolon sediaan injeksi menggunakan hewan coba berupa mencit. Salah satu contoh sampel antibiotik kuinolon sediaan injeksi adalah Dufafloxacin 10% Inj® yang merupakan antibiotik untuk mengatasi kasus infeksi pada

saluran respirasi dan gastrointestinal. Aplikasi pemberian obat tersebut melalui injeksi secara subkutan atau intramuscular.

Hasil uji toksisitas abnormal sampel kuinolon sediaan injeksi membuktikan bahwa injeksi intravena menggunakan sampel kuinolon dengan dosis sesuai label yang tertera dikemasan sampel tidak menimbulkan gejala klinis sakit maupun kematian pada mencit. Pertambahan bobot terjadi pada semua kelompok perlakuan mengikuti pertambahan umur mencit. Hasil ini mengindikasikan bahwa pemberian antibiotik kuinolon dengan dosis sesuai label yang tertera pada mencit tidak menyebabkan gangguan bobot badan, tidak memiliki efek samping secara klinis, dan tidak menyebabkan kematian. Dengan demikian, sampel kuinolon tersebut dinyatakan tidak toksik.

Kesalahan selama penyimpanan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi mutu obat diantaranya ketidaksesuaian suhu, kelembaban dan intensitas cahaya pada tempat penyimpanan obat (Ardiningtyas dkk., 2019). Suhu penyimpanan yang tinggi mempercepat reaksi oksidasi, reduksi dan hidrolisis yang menyebabkan degradasi obat. Kadar 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 (Mansour dkk., 2018).

Apabila dikaitkan dengan penyimpanan, sampel kuinolon yang diperoleh dalam kegiatan pengkajian tahun 2023 yang tidak memenuhi persyaratan kadar tersebut berasal dari distributor obat hewan. Penyimpanan yang dilakukan di distributor obat hewan tersebut telah mengikuti aturan penyimpanan

obat yang tertera dalam label, terdapat termohigrometer dalam ruangan penyimpanan guna memantau suhu dan kelembaban ruangan. Kemungkinan yang lain dapat terjadi adalah adanya ketidaksesuaian kadar bahan baku yang digunakan dalam periode produksi obat. Tidak adanya pengecekan kesesuaian antara *certificate of analysis* (COA) dan kadar sebenarnya bahan baku yang akan digunakan per kedatangan oleh *quality control* dalam suatu produsen obat bisa menjadikan hasil produksi tidak sesuai dengan kandungan obat yang dibuat dengan yang dinyatakan dalam label produk obat jadi tersebut.

Berdasarkan hasil pengkajian tahun 2023 didapatkan bahwa 228 sampel (96,61%) dinyatakan memenuhi syarat mutu dan 8 sampel (3,39%) tidak memenuhi syarat mutu yang telah ditetapkan. Menindaklanjuti hasil tersebut, kegiatan pengawasan obat hewan oleh pengawas obat hewan pusat, provinsi dan kabupaten/ kota harus terus ditingkatkan guna mencegah terjadinya penyalahgunaan dalam hal pembuatan, penyediaan, penyimpanan, peredaran maupun dalam pemakaian obat hewan. Hal tersebut menjadi penting dilakukan mengingat bahaya penyalahgunaan obat hewan tersebut dapat menimbulkan bahaya resistensi antimikroba ke masyarakat luas. Menurut Palupi dkk (2020), penggunaan antimikroba yang sama di manusia dan hewan produksi diduga sebagai salah satu penyebab timbul dan menyebarnya bakteri resisten antimikroba pada manusia. Sehingga perlu adanya penatagunaan antimikroba yang bijak dan bertanggung jawab serta meningkatkan pemahaman, kepedulian dan kesadaran terkait resistensi antimikroba.

KESIMPULAN

Total sebanyak 236 sampel antibiotik golongan kuinolon yang diambil di Sembilan provinsi dan tujuh perusahaan importir obat

hewan telah dilakukan pengujian dan diperoleh hasil sebanyak 228 sampel memenuhi persyaratan mutu obat hewan. Delapan sampel lainnya tidak memenuhi syarat pada uji kadar. Kegiatan pengawasan obat hewan oleh pengawas obat hewan pusat, provinsi dan kabupaten/ kota harus terus ditingkatkan guna mencegah terjadinya penyalahgunaan dalam hal pembuatan, penyediaan, penyimpanan, peredaran maupun dalam pemakaian obat hewan yang berdampak pada bahaya resistensi antibiotik. Sehingga perlu adanya penatagunaan antimikroba yang bijak dan bertanggung jawab serta meningkatkan pemahaman, kepedulian dan kesadaran terkait resistensi antimikroba.

DAFTAR PUSTAKA

- Amam. 2022. Sebuah Evaluasi Keberhasilan Usaha Ternak Ayam Broiler Sistem Kemitraan Inti Plasma. *Jurnal Pangan Vol 31 No 3 tahun 2022*.
- Ardiningtyas, Bondan, Syahreni dan Dwi. 2019. Gambaran Penyebab dan Kerugian karena Obat Rusak dan Kedaluarsa di Apotek Wilayah Kota Yogyakarta. *Research Gate*.
- Ayun, A.Q., Faridah, D.N., Yuliana, N.D. dan Andriyanto. 2021. Pengujian Toksisitas Akut LD₅₀ Infusa Benalu Teh (*Scurrula* sp.) dengan Menggunakan Mencit (*Mus musculus*). *Acta Veterinaria Indonesiana* Vol. 9, No. 1: 53-63, Maret 2021.
- [BPOM] Badan Pengawas Mutu Obat dan Makanan. 2023. 5.1.6. *Kuinolon*. <https://pionas.pom.go.id/ioni/bab-5-infeksi/51-antibakteri/516-kuinolon>. Akses 21 Agustus 2023.
- [DJPKH] Direktorat jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2009. *Farmakope Obat Hewan Indonesia (Farmasetik dan Premiks) Jilid II Edisi 4*. Direktorat jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian.
- [DJPKH] Direktorat jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2021. *Indeks Obat Hewan Indonesia, Edisi XIII*. Asosiasi Obat Hewan Indonesia. Jakarta.
- [DJPKH] Direktorat jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2022. *Suplemen Farmakope Obat Hewan Indonesia Sediaan Farmasetik dan Premiks Edisi IV*. Direktorat jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian.
- Efendi, R., Sudarnika, E., Wibawan, I.W.T., dan Purnawarman, T. 2022. An assessment of knowledge and attitude toward antibiotic misuse by small-scale broiler farmers in Bogor, West Java, Indonesia. *Vet World* 15(3): 707–713.
- Gandjar, I.G dan Rohman, A. 2012. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Kergaravat, S.V., Hernandez, S.R., dan Gagneten, A.M. 2021. Second-, Third- and Fourth-Generation Quinolones : Ecotoxicity Effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* Species. *Chemosphere* 262 (2021) 127823.
- Kusuma, Y. 2023. Kondisi Industri Obat Hewan. *Majalah Poultry Indonesia Edisi Februari 2023 Volume XVIII*.
- 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.
- Millanao, A.R., Mora, A.Y., Villagra, N.A., Bucarey, S.A. dan Hidalgo, A.A. 2021. Biological Effects of Quinolones: A Family of Broad Spectrum Antimicrobial Agents. *Molecules* 26(23):7153.
- [OIE] World Organisation for Animal Health. 2021, *Oie List of Antimicrobial Agents Of Veterinary Importance (June 2021)*. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>. Akses 21 Agustus 2023.
- Palupi, M.F., Andesfha, E., Hayati, M., Kartini, D., Nugraha, E., Dan Atikah, N. 2020. Deteksi Gen Resistan Siprofloksasin Qnra, Qnrb, dan Qnrs pada *Escherichia Coli* Multiresistan Kolistin Dan Siprofloksasin. *Penyidikan Penyakit Hewan Rapat Teknis Dan Pertemuan Ilmiah (RATEKPIL) Dan Surveilans Kesehatan Hewan Tahun 2020*. Hal 403-411.
- 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.

- Pham, T.D.M., Ziora, Z.M., dan Blaskovich, M.A.T. 2019. *Quinolone Antibiotics*. MedChemComm Accepted Manuscript, DOI : 10.10039/C9MD00120D.
- Radji, M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Sari, R.A., Palupi, M.F., Ambarwati, Khomariyah, S., Rusmiati, E., Indrishanty, I., Fanani, F.A., Ariyani, N., Nurhidayah, Indriyana dan Jannah, A.M. 2022. Pengkajian Mutu Antibiotik Golongan (Fluoro)Kuinolon Di Delapan Provinsi Di Indonesia Tahun 2022. *Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan No 31 tahun 2022*.
- Sarkozy,G. 2001. Quinolones : A Class of Antimicrobial Agents. *Vet. Med. – Czech*, 46, (9-10): 257-274.
- Trouchon, T. dan Lefebvre, S. 2016. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Medicine. *Open Journal of veterinary Medicine*, 6, 40-58.
- Yuda, P.E.S.K. dan Suena, 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.