



KEMENTERIAN PERTANIAN

BULETIN PENGUJIAN MUTU OBAT HEWAN

No : 29 Tahun 2020

ISSN : 0852-9612



**BALAI BESAR PENGUJIAN MUTU DAN SERTIFIKASI OBAT HEWAN
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
KEMENTERIAN PERTANIAN
2020**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadirat Allah SWT atas terbitnya Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan No. 29 Tahun 2020. Dunia kesehatan hewan, khususnya obat hewan berkembang sangat cepat dan dinamis. Oleh karena itu BBPMSOH dituntut untuk sigap dalam mengantisipasi perkembangan teknologi dan metode pengujian, tanggap dalam perkembangan kondisi peternakan dan kesehatan hewan nasional, berperan aktif dalam pemberdayaan sumber daya nasional khususnya dalam bidang obat hewan agar mampu mewujudkan sasaran pembangunan peternakan, kesehatan hewan, dan ekonomi dalam kaitannya mendukung gerakan tiga ekspor (gratieks) obat hewan.

Buletin edisi kali ini kami hadirkan studi terkait *antimicrobial resistance* (AMR) dimana pengujian resistensi isolat *E. coli* terhadap kolistin dan deteksi gen *mcr-1* dari sampel usap kloaka broiler, tinjauan ilmiah antibiotik dan mekanisme resistensi antimikroba, validasi metode uji dan ketidakpastiaan pengukuran sediaan obat hewan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, serta uji mutu vaksin AI dan kajian titer antibodi ayam petelur pascavaksinasi AI. Semua artikel ilmiah tersebut sesuai dengan tugas dan fungsi BBPMSOH dalam melakukan pengujian, pengkajian, pemantauan mutu obat serta pengembangan metode analisis obat hewan.

Kami berharap dengan terbitnya buletin ini dapat memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, khususnya terkait dengan obat hewan. Terlebih, agar kami dapat terus berkreasi untuk menerbitkan artikel-artikel ilmiah yang lebih informatif, bermanfaat, dan dapat memajukan dunia kesehatan hewan. Kami mengharapkan kritik dan saran yang membangun bagi penyempurnaan Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan edisi berikutnya.

Bogor, November 2020

Pimpinan Redaksi

KATA SAMBUTAN

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

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

Bogor, November 2020

Kepala Balai Besar,

drh. Maidaswar, M.Si
NIP. 196705191994031001

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
KATA SAMBUTAN	ii
DAFTAR ISI	iii
1. Isolasi <i>Escherichia coli</i> dan Deteksi Gen <i>mobilized colistin resistance (mcr)-1</i> pada <i>Escherichia coli</i> Resistan Kolistin dari Sampel Usap Kloaka Broiler di Tujuh Provinsi di Indonesia	1
<i>Ernes Andesfha, Meutia Hayati, Dina Kartini, Maria Fatima Palupi, Neneng Atikah, Istiyaningsih, Joen Firmanta, Novy Rianti, Sarji, Deden Amijaya, Nurhidayah, Siti Komariah, Sri Arofah</i>	
2. Validasi Metode Uji Kadar Sediaan Diklazuril Serbuk Tunggal Dengan Pelarut Sodium Asetat Trihidrat Dalam Metanol Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	15
<i>Maria Fatima Palupi, Siti Khomariyah, Eli Nugraha, Emi Rusmiati, Nafisah Idrishanty</i>	
3. Validasi Metode Uji Kadar Albendazole Suspensi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	25
<i>Ambarwati, Rosana Anita Sari, Siti Khomariyah, Nafisah Idrishanty, Maria Fatima Palupi, Emi Rusmiati, Luckyana Cerry</i>	
4. Tinjauan Ilmiah Antibiotik Dan Mekanisme Resistansi Antimikroba Pada Bakteri	33
<i>Muhammad Zahid, Isnindar</i>	
5. Estimasi Ketidakpastian Pengukuran Uji Kadar Siprofloksasin Sediaan Serbuk Dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	50
<i>Maria Fatima Palupi, Rosana Anita Sari, Ambarwati</i>	
6. Kajian Titer Antibodi Ayam Petelur Pascavaksinasi Avian Influenza (AI) Di Delapan Provinsi Di Indonesia	59
<i>Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Rahajeng Setiawaty, Yati Suryati</i>	
7. Uji Potensi Vaksin Avian Influenza	65
<i>Nur Khusni Hidayanto, Yati Suryati</i>	
8. Pengkajian Mutu Vaksin Avian Influenza (AI) Sub Tipe H5N1 Di Tujuh Provinsi Di Indonesia Tahun 2019	70
<i>Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Dina Kartini, Dewi Astuti</i>	

Isolasi *Escherichia coli* dan Deteksi Gen *mobilized colistin resistance (mcr)-1* pada *Escherichia coli* Resistan Kolistin dari Sampel Usap Kloaka Broiler di Tujuh Provinsi di Indonesia

Ernes Andesfha¹, Meutia Hayati¹, Dina Kartini¹, Maria Fatima Palupi², Neneng Atikah¹, Istiyarningsih¹, Joen Firmanta¹, Novy Rianti¹, Sarji¹, Deden Amijaya¹, Nurhidayah², Siti Komariah², Sri Arofah³

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

Email: ernesandesfha@ymail.com

ABSTRAK

Penggunaan antibiotik yang intensif dalam upaya pencegahan dan pengobatan infeksi bakteri dalam bidang peternakan berdampak pada munculnya bakteri resistan yang memberikan ancaman besar dalam kehidupan manusia dan hewan. Kolistin merupakan *last drug choice* bagi pengobatan infeksi multiresistan bakteri gram negatif pada manusia. Gen *mcr-1* merupakan gen resistan kolistin yang mampu dipindahkan secara horizontal. Tujuan kajian ini adalah untuk mendapatkan data *E. coli* patogen dan non patogen, prevalensi *E. coli* resistan kolistin, dan deteksi gen *mcr-1* pada *E. coli* resistan kolistin. Sampel yang diuji adalah 48 *pool* sampel usap kloaka ayam broiler yang diambil dari peternakan broiler di Provinsi Sumatera Utara, Lampung, Banten, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Sulawesi Selatan. Isolasi *E. coli* menggunakan metode SNI 2897:2008, uji patogenesitas menggunakan uji *congo red*, uji kepekaan kolistin menggunakan metode *agar dilution*, dan deteksi gen resistan *mcr-1* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil isolasi dari sampel *pool* usap kloaka diperoleh 159 isolat *E. coli*, sebanyak 69 isolat *E. coli* (43,40%) merupakan isolat patogen dan 90 isolat *E. coli* (56,60%) merupakan isolat non patogen. Prevalensi *E. coli* resistan kolistin adalah 21,38% (CI 95%; CL 15,73-28,39%) dan prevalensi *E. coli* resistan kolistin positif *mcr-1* adalah 15,72% (CI 95%; CL 10,88-22,18%). Keterkaitan genotipik *mcr-1* dan fenotipik *E. coli* resistan kolistin cukup tinggi, hal ini ditunjukkan 73,53% *E. coli* resistan kolistin memiliki gen *mcr-1*. Dua puluh isolat (28,90%) dari isolat *E. coli* patogen ternyata resistan terhadap kolistin. Empat belas isolat (15,60%) dari 90 isolat *E. coli* non patogen menunjukkan resistan terhadap kolistin. Keberadaan *E. coli* patogen resistan kolistin dan memiliki gen *mcr-1* dapat menyebabkan infeksi akan semakin sulit diobati. *E. coli* non patogen resistan kolistin memiliki gen *mcr-1* dapat memberikan bahaya yang besar. Hal ini disebabkan, meskipun bakteri ini tidak menyebabkan infeksi tetapi mampu menyebarkan sifat resistansinya secara horizontal terhadap bakteri lain dan dapat menyebar ke manusia. Hasil kajian ini menunjukkan ancaman resistansi yang cukup serius mengingat prevalensi *E. coli* resistan kolistin dalam kajian ini masuk dalam kategori tinggi. Oleh sebab itu, pelarangan penggunaan kolistin pada hewan produksi merupakan langkah yang tepat untuk mengurangi risiko peningkatan resistansi kolistin.

Kata kunci: *E. coli*, patogen, resistan, kolistin, gen *mcr-1*

ABSTRACT

The intensive use of antibiotics in the prevention and treatment of bacterial infections in livestock has resulted in the emergence of resistant bacteria which pose a major threat to human and animal life. Colistin is the last drug of choice for the treatment of multiresistant infection with gram-negative bacteria in humans. The mcr-1 gene is a colistin resistance gene that can be transferred horizontally. This study aimed to obtain data on pathogenic and non-pathogenic E. coli, the prevalence of colistin-resistant E. coli, and to detect mcr-1 gene from colistin-resistant E. coli. The samples tested were 48 pools sample of cloacal swab broilers were taken from broiler farms from the provinces of North Sumatra, Lampung, Banten, West Java, Central Java, East Java, and South Sulawesi. Isolation of E. coli using the SNI 2897: 2008 method, the pathogenicity test using the congo red test, the colistin sensitivity test using the agar dilution method, and the detection of the mcr-1 resistance gene using the polymerase chain reaction (PCR) method. The isolation results from the cloacal usap pool samples obtained 159 E. coli isolates, a total of 69 E. coli isolates (43,40%) were pathogenic isolates and 90 E. coli isolates (56,60%) were non-pathogenic isolates. The prevalence of colistin-resistant E. coli was 21,38% (95% CI; CL 15,73-28,39%) and the prevalence of mcr-1 positive colistin-resistant E. coli was 15,72% (95% CI; CL 10,88-22,18%). The agreement between genotypically mcr-1 gene and phenotypically colistin-resistant E. coli is quite high, this is indicated by 73,53% of colistin-resistant E. coli has the mcr-1 gene. Twenty isolates (28,90%) of the pathogenic E. coli isolates were found resistant to colistin. Fourteen isolates (15,60%) of non-pathogenic E. coli isolates showed resistance to colistin. The presence of the colistin-resistant pathogenic E. coli that has the mcr-1 gene can make the infection more difficult to treat. Colistin-resistant non-pathogenic E. coli has the mcr-1 gene which can pose a great danger because although this bacterium does not cause infection, it can spread its resistance gene horizontally to other bacteria and can spread to humans. The results of this study indicate a serious threat of resistance given that the prevalence of colistin-resistant E. coli in this study falls into the high category. Therefore, prohibiting the use of colistin in production animals is the right step to reduce the risk of increased colistin resistance.

Keywords: *E. coli*, pathogen, resistant, colistin, mcr-1 gene

PENDAHULUAN

Perhatian dan fokus dunia dalam 10 tahun terakhir ini banyak tertuju kepada isu *Antimicrobial Resistance* (AMR) sebagai salah satu dampak penggunaan antibiotik yang tidak bijaksana. AMR menjadi isu global karena permasalahannya sangat kompleks dan upaya pengendaliannya membutuhkan peran dari semua pihak di bidang kesehatan hewan dan manusia sebagai satu kesatuan kesehatan dunia. Penelitian, kajian, dan informasi tentang dampak dari AMR telah banyak dilakukan. Akibat dari AMR antara lain, angka morbiditas menjadi meningkat, angka mortalitas meningkat, periode infeksi lebih lama, produktifitas ternak menurun, dan biaya pengobatan atau perawatan meningkat.

E. coli adalah bakteri komensal yang sebagian besar adalah bakteri aerobik yang secara normal terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas. Keberadaan *E. coli* dianggap sebagai indikator utama kontaminasi feces pada makanan dan air⁽¹⁹⁾. Banyak strain *E. coli* dapat muncul sebagai patogen karena keberadaan faktor patogenik tertentu dan gen virulen yang terletak pada *element genetic* dan sebagai pembeda dari strain *E. coli* komensal⁽³⁸⁾. *Colibacillosis* adalah infeksi *E. coli* patogen yang sangat umum yang menyebabkan kerugian ekonomi pada peternakan unggas karena menurunkan produktivitas, meningkatkan mortalitas, pengafkiran karkas terinfeksi, meningkatkan biaya pencegahan, dan pengobatan unggas yang terinfeksi⁽²⁶⁾. *E. coli* juga banyak digunakan untuk pemantauan dan surveilans resistansi antimikroba⁽⁴⁵⁾. Peternakan unggas yang terinfeksi *E. coli* akan menjadi sumber penularan antar ayam dalam peternakan tersebut serta lingkungannya, sehingga tidak menutup kemungkinan lingkungan yang terkontaminasi bisa menjadi sumber terjadinya *foodborne zoonoses diseases*. Apabila *E. coli* memiliki gen penyandi resistan maka bakteri tersebut dapat menyebarkan gen resistan antar ayam di lingkungan di peternakan dan juga

menyebarkan ke manusia yang mengonsumsi produk unggas.

Berdasarkan Keputusan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan (DJKPH) Nomor 09111/Kpts/PK 300/F/09/2018 tentang Petunjuk Teknis Penggunaan Obat Hewan Dalam Pakan untuk Tujuan Terapi, menyatakan bahwa antibiotik dapat dicampur dalam pakan untuk keperluan terapi. Penggunaan antibiotik dalam pakan yang tidak sesuai dosis terapi akan menimbulkan dampak buruk pada ternak, yaitu apabila dosis terlalu tinggi dapat menimbulkan efek toksik, sedangkan jika dosis terlalu rendah akan tidak memiliki efek terapi yang diharapkan.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 53/Permentan/OT.140/5/2013 tentang Organisasi dan Tata Kerja BBPMSOH mempunyai tugas pokok dan fungsi antara lain melaksanakan *monitoring* efek samping obat hewan. AMR merupakan salah satu efek samping penggunaan antimikroba yang tidak bijaksana. Dalam hal ini, resistansi dapat mempengaruhi efikasi antimikroba saat digunakan dalam pengobatan hewan, sehingga AMR masuk dalam *pharmacovigilance*. Guna melaksanakan tupoksi tersebut Unit Uji Bakteriologi, Farmasetik dan Premiks, dan Bioteknologi BBPMSOH melakukan kegiatan pengkajian *E. coli* dalam rangka pemetaan AMR dengan cara mengambil sampel usap kloaka dari peternakan ayam broiler. Tujuan kegiatan pengkajian ini untuk (1) mendapatkan isolat *E. coli* dari sampel usap kloaka ayam broiler, (2) mendapatkan data isolat *E. coli* patogen dan non patogen, (3) memperoleh data prevalensi isolat *E. coli* resistan kolistin, (4) keberadaan gen *mcr-1* dari isolat *E. coli* resistan kolistin, dan (5) melihat keterkaitan genotip *mcr-1* dengan fenotip resistan kolistin pada *E. coli* yang didapatkan dari tujuh provinsi di Indonesia.

Kolistin merupakan antibiotik yang masuk dalam *highest critically important antimicrobials for human* dan kolistin banyak digunakan di hewan produksi. Adapun pemilihan gen *mcr-1*, disebabkan karena gen ini merupakan gen

resistan kolistin yang pertama kali ditemukan mampu dipindahkan melalui plasmid⁽²⁵⁾. Hasil kajian ini diharapkan diperoleh *output* data tentang gambaran pola resistansi *E. coli* terhadap kolistin sulfat di peternakan ayam pedaging atau broiler. Data tersebut dapat menjadi bahan dasar kebijakan DJPKH dalam upaya mengurangi penyebaran AMR, mengatur pemakaian antibiotik untuk pakan terapi dan pemilihan antibiotik untuk terapi di bidang kesehatan hewan di Indonesia.

METODE

Waktu, Tempat, dan Lingkup Pengkajian

Kegiatan pengkajian ini terbagi dalam dua tahap yaitu tahap pengambilan sampel di tujuh provinsi dilaksanakan bulan Agustus-September 2019 dan tahap pengujian sampel di BBPMSOH dilaksanakan bulan September-November 2019. Tahap pengujian meliputi isolasi *E. coli*, uji patogenitas *E. coli* di Unit Uji Bakteriologi, uji kepekaan kolistin di Unit Uji Farmasetik, dan deteksi gen *mcr-1* di Unit Bioteknologi.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada isolasi dan uji patogenitas *E. coli* adalah *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Buffer Phosphate Water* (BPW), media *Lauryl Tryptose Broth* (LSTB) (Difco, USA), *Escherichia Medium* (ECM) (Difco, USA), *Eosin Methylene Blue* (EMB) (Oxoid, UK), *Heart Infusion Agar* (HIA) (Difco, USA), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Simmons Citrat Agar* (SCA) (Oxoid, UK), *Sulfide Indole Motility agar* (SIM) (Oxoid, UK), Reagen *Alph-anaphtol*, *Potassium Hydroxide* (KOH), *Methyl Red-Voges Proskauer broth* (MR-VP) (Merck, Germany), *Methyl Red* (Kanto Chemical, Japan), *Congo Red* (Sigma, USA). Bahan yang digunakan untuk uji kepekaan *E. coli* terhadap kolistin sulfat adalah agar Mueller-Hinton (MHA) (Difco/DB, USA), standar kolistin sulfat (Sigma-USA), *distillated water* steril, *Heart Infusion Broth* (HIB) (Difco, USA), dan *E. coli* ATCC25922 sebagai kontrol. Adapun untuk uji deteksi gen *mcr-1* diperlukan,

primer *mcr-1*, *Prepman solution*, *Kit HotStarTaq® Master Mix Kit* (Qiagen, Germany), *Agarose Gel*, *SYBR Safe DNA Gel Stain*, *DNA Ladders 100 bp*, *Loading dye*, dan *TAE Buffer10X*.

Alat-alat yang digunakan antara lain timbangan digital, tabung reaksi, *erlenmeyer*, gelas ukur, ose, cawan petri, autoklaf, pipet 1 mL, 2 mL, 5 mL, 9 mL dan 10 mL, pH meter, tabung mikrotube 200 µL, mikropipet dan tips volume 10 µL, 100 µL, 1000 µL, *hot plate*, inkubator 35°C dan 42°C, *bench hood*, mikrospin, mikrosentrifuse, *ice plate*, vortex, microwave, cetakan *agarose* dan *comb*, mesin PCR *thermal cycler* (ABI Veriti, Applied Biosystems, USA), peralatan elektroforesis dan peralatan *gel documentation system* (FireReader V10, Cleaver Scientific, UK).

Sampel Pengkajian

Pemilihan lokasi sampling berdasarkan metode *proportional sampling* dengan melihat jumlah populasi broiler berdasar buku Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan tahun 2018. Sampel diambil dari 7 provinsi (Tabel 1), pada setiap provinsi dipilih 1-2 kabupaten/kota, sampel yang diambil berupa usap kloaka. Minimal besaran sampel, dalam hal ini satuan terkecil adalah jumlah kandang broiler, yang disampling dihitung dengan menggunakan rumus:

$$n = (1.96^2 \times (P(1-P))) / e^2$$

Besaran sampel dinyatakan dalam n, P adalah prevalensi dengan menggunakan hasil penelitian Palupi *et al.* (2019), dengan tingkat kepercayaan 95%, dan e adalah tingkat kesalahan maksimum (10%). Sehingga didapatkan jumlah minimum sampel yang harus diambil adalah 44 kandang. Oleh sebab itu, tiap kali pengambilan di provinsi diambil enam kandang broiler dan karena di Jawa Barat dilakukan dua kali pengambilan, maka di Jawa Barat diambil 12 kandang, sehingga keseluruhan besaran sampel didapatkan 48 kandang.

Pool usap kloaka diambil dari 5 ayam broiler hidup / kandang menggunakan *cotton usap* steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi media pembawa (PBS) steril. Sampel usap dibawa ke laboratorium dengan menggunakan *cooler box*.

Isolasi *Escherichia coli*

Isolasi *E. coli* menggunakan metode uji berdasar SNI 2987:2008, isolasi meliputi tahap pra-pengayaan, pengayaan, agar selektif, dan uji biokimia⁽⁴⁰⁾. Sampel yang menunjukkan reaksi positif *E. coli* hingga tahap pengujian biokimia dilakukan uji lanjutan yaitu uji patogenitas *E. coli* secara invitro dengan menggunakan uji *congo red* ⁽⁴⁾.

Pra-pengayaan dilakukan sebagai berikut sampel *pool* usap kloaka dalam media PBS diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL media LSTB steril dan dihomogenkan dengan vortex, selanjutnya diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam ± 2 jam. Isolasi *E. coli* pada agar selektif dilakukan dengan cara mengambil satu ose sampel yang telah diinkubasi dalam media pengayaan kemudian ditanam pada agar EMB dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam ± 2 jam. Koloni tunggal tipikal *E. coli* berwarna keemasan, dan diambil 3-5 koloni tunggal untuk setiap *pool* sampel. Selanjutnya tiap koloni dilakukan purifikasi dengan mengkultur koloni tunggal pada media EMB dan media

umum HIA untuk kemudian dilanjutkan ke uji biokimia.

Uji biokimia dengan menanam koloni *E. coli* ke media TSI agar miring, media SIM untuk uji indol, media MR-VP untuk uji MR-VP, dan media sitrat agar untuk uji sitrat. Bakteri dinyatakan sebagai *E. coli* jika: (1) setelah inkubasi pada media TSI pada bagian permukaan miring (*slant*) berwarna kuning dan tidak memproduksi H₂S, (2) pada uji indol *E. coli* menunjukkan hasil positif dengan terbentuk cincin merah, (3) pada uji VP negatif tidak terjadi perubahan warna pada media setelah ditetesi dengan pereaksi *Alpha-naphthol* dan KOH, (4) pada uji MR positif, dan (5) pada uji sitrat hasilnya negatif yaitu tidak ada perubahan pada media yang tetap berwarna hijau.

Uji Patogenitas *Escherichia coli*

Uji patogenitas *E. coli* secara invitro menggunakan media *congo red*⁽⁴⁾. Isolat *E. coli* yang sudah dipurifikasi dibiakkan pada media agar *congo red* dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Inkubasi kemudian dilanjutkan pada suhu kamar selama 48 jam. Koloni yang berwarna merah (mengikat *congo red*) adalah isolat *E. coli* patogen sedangkan koloni yang berwarna putih (tidak mengikat *congo red*) adalah isolat *E. coli* non patogen.

Tabel 1 Data lokasi dan besaran *pool* sampel pengkajian

Provinsi	Kabupaten	Jumlah <i>pool</i> usap kloaka
Sumatera Utara	Kab. Deli Serdang	6
Lampung	Kota Bandar Lampung	6
Banten	Kab. Tangerang	6
Jawa Barat	Kab. Bogor, Kab. Bekasi	12
Jawa Tengah	Kab. Batang, Kota Semarang	6
Jawa Timur	Kab. Mojokerto, Kota Surabaya	6
Sulawesi Selatan	Kab. Maros, Kota Makassar	6
Total		48

Uji Kepekaan *Escherichia coli* Terhadap Kolistin

Uji kepekaan atau resistansi *E. coli* kolistin dilakukan dengan metode *agar dilution* (AD) untuk menentukan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) ^(4,12,28). Media yang digunakan adalah MHA yang mengandung standar kolistin sulfat dengan konsentrasi kelipatan dua dari 0,125 µg/mL hingga 16 µg/mL. *E. coli* ATCC25922 digunakan sebagai isolat kontrol sedangkan MHA tanpa kolistin sulfat digunakan sebagai media kontrol ⁽¹⁰⁾. Isolat dinyatakan resistan kolistin jika nilai KHM > 2 µg/mL ⁽¹⁴⁾. Metode AD memberikan kecenderungan memberikan nilai KHM lebih tinggi dari metode *broth microdilution* (BMD), akan tetapi metode AD sangat berguna untuk menentukan resistansi kolistin. Apabila dibandingkan dengan metode BMD, yang merupakan metode rujukan untuk resistansi kolistin, metode AD menunjukkan tingkat *very major errors* (hasil *false-susceptible*) 0,7–3,3 % yang rendah dan tingkat *major errors* (hasil *false-resistant*) 2,4–4,9% ^(3,12). Menurut penelitian Turlec-Rogacka *et al.* (2018) metode AD menunjukkan tingkat reproduibilitas, *robustness*, dan tingkat kemudahan yang jauh lebih tinggi jika dibandingkan uji BMD untuk uji resistansi kolistin⁽⁴²⁾.

Uji Deteksi Gen *mcr-1*

Isolat *E. coli* resistan kolistin ditumbuhkan di media HIA selama 24 jam pada suhu 37°C. *E. coli* yang telah tumbuh di media HIA diekstraksi dengan menggunakan metode *boiling* yaitu koloni diambil sebanyak 1/2 ose dan dilarutkan dengan 100 µl PBS steril. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10–30 detik dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Sampel yang telah dipanaskan kemudian didinginkan selama 2 menit di suhu ruang, selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 2 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 50 µL sebagai *master stock* DNA⁽¹³⁾.

Deteksi gen *mcr-1* sebagai gen penyandi resistansi terhadap kolistin menggunakan

metode PCR *simplex* dengan panjang amplicon 309 bp. Komposisi reagen *master mix* PCR menggunakan kit PCR *HotStarTaq*® *Master Mix Kit* Qiagen, volume total 25 µL yang terdiri dari 12,5 µL *HotStarTaq master mix*, 1 µL primer *forward* (5 µM) 5'-CGGTCAGTCC GTTTGTTC-3', 1 µL primer *reverse* (5 µM) 5'-CTTGGTCGG TCTGTAGGG-3'⁽²⁵⁾, 5,5 µL dH₂O, dan 5 µL DNA *template*. Proses PCR dilakukan dengan siklus pre denaturasi 95°C selama 15 menit, dilanjutkan dengan 25 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 57,5°C selama 90 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Pembacaan hasil PCR melalui tahap elektroforesis menggunakan *agarose gel* 1,5%, adapun pewarnaan *SYBR safe* dan marker 100 bp menggunakan mesin *gel documentation system*. Hasil positif gen *mcr-1* ditunjukkan dengan munculnya pita dengan panjang amplicon 309 bp. Sebagai kontrol positif digunakan isolat *E. coli* yang memiliki gen *mcr-1* dari penelitian Palupi *et al.* (2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dari 48 sampel *pool* usap kloaka ayam broiler diperoleh 159 isolat *E. coli*. Selanjutnya 159 isolat *E. coli* diuji patogenitas secara invitro pada media *congo red* dan diperoleh hasil 69 isolat *E. coli* patogen (43,40%) dan 90 isolat adalah *E. coli* non patogen (56,60%) (Tabel 2). *E. coli* patogen terisolasi paling banyak dari sampel usap kloaka yang berasal dari Provinsi Jawa Barat yaitu sebesar 18,84% (13/69), Jawa Tengah 17,39% (12/69), dan Banten 15,94% (11/69). Persentase *E. coli* non patogen tertinggi dari Jawa Barat sebesar 25,55% (23/90), selanjutnya Jawa Timur dan Sulawesi Selatan masing-masing sebesar 20% (18/90) (Tabel 2). Hal ini disebabkan karena jumlah sampel dari Jawa Barat lebih banyak dari provinsi lainnya karena dilakukan sampling sebanyak 2 kali dan diambil dari 12 kandang, sedangkan di provinsi lain hanya di 6 kandang. Apabila dilihat berdasarkan jumlah isolat perprovinsi, maka

Tabel 2 Persentase *E. coli* patogen dan *E. coli* non patogen dari tujuh provinsi

Propinsi	Kabupaten/ Kota	<i>E. coli</i> non patogen		<i>E. coli</i> patogen	
		Jumlah isolat	Persentase <i>E. coli</i> non patogen	Jumlah isolat	Persentase <i>E. coli</i> patogen
Sumatera Utara	Deli Serdang	9	10,00%	9	13,04%
Lampung	Bandar Lampung	9	10,00%	9	13,04%
Banten	Tangerang	7	7,78%	11	15,94%
Jawa Barat	Bogor, Bekasi	23	25,56%	13	18,84%
Jawa Tengah	Batang, Kota Semarang	6	6,67%	12	17,39%
Jawa Timur	Mojokerto, Kota Surabaya	18	20,00%	6	8,70%
Sulawesi Selatan	Maros, Kota Makassar	18	20,00%	9	13,04%
Total		90	100%	69	100%
Persentase dari total isolat <i>E. coli</i>		90/159 (56,60%)		69/159 (43,40%)	

sampel dari Sumatera Utara dan Lampung memiliki persentase *E.coli* patogen tertinggi yaitu masing-masing 50% (masing-masing 9/18). *E. coli* termasuk bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan merupakan mikroflora normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Meskipun demikian terdapat beberapa serotipe *E. coli* bersifat patogen yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia dan hewan⁽¹⁷⁾. Media *Congo red* digunakan untuk mengetahui sifat patogenitas bakteri *E. coli* secara invitro. Bakteri *E. coli* yang bersifat patogen akan bereaksi positif dengan mengikat zat warna yang terdapat dalam media *Congo red* sehingga koloni *E. coli* patogen akan berwarna merah. Kemampuan *E. coli* patogen ini mengikat warna dalam media *Congo red* ini dapat digunakan sebagai penanda fenotip untuk membedakan isolat *E. coli* yang bersifat invasif menyebabkan septikemia pada unggas dan *E. coli* non invasif yang bersifat komensal/flora normal⁽⁴⁾. Menurut Gjessing dan Berkhoff (1988), ada korelasi yang kuat antara ekspresi fenotip *E. coli* pada media *Congo red* dengan sifat virulensinya. *E. coli* non patogen yang tidak mampu mengikat zat warna yang terdapat dalam media *Congo red* sehingga koloni yang terbentuk berwarna putih⁽¹⁸⁾.

Berkhoff dan Vinal (1985) menyatakan umumnya isolat *E.coli* bereaksi positif pada media *Congo red* akan hilangnya kemampuan mengikat warna *Congo red* jika disub kultur pada media kompleks seperti media *blood agar*⁽⁴⁾. Kemampuan bakteri mengikat warna pada media *Congo red* kemungkinan melibatkan polisakarida yang terdapat dalam dinding sel bakteri Gram negatif yang mengandung komponen polisakarida pada membran luarnya berupa *glukose β-1-3 (β-D-glucan)*, polisakarida ini bersifat kurang imunogenik sehingga digunakan bakteri untuk menghindari dari sistem imun inang⁽⁴⁾. Infeksi *E. coli* patogen pada unggas umumnya bersifat sistemik dan menimbulkan bakteremia⁽⁵⁾. Menurut Brito *et al.* (2003) infeksi *E. coli* patogen berupa selulitis cenderung menginfeksi ayam broiler dan menyebabkan kerusakan karkas dan peningkatan angka afkir sampai 42,5%⁽⁶⁾. Sehingga, secara ekonomi infeksi *E. coli* patogen pada unggas sangat merugikan peternak^(44,22).

Hasil uji sensitifitas atau kepekaan terhadap antibiotik kolistin sulfat menunjukkan 34 dari 159 isolat resistan terhadap kolistin sulfat sehingga didapatkan prevalensi *E. coli* resistan kolistin adalah 21,38% (CI 95%; CL 15,73-28,39%). Nilai prevalensi ini termasuk tinggi dengan

rincian 58,82% (20/34) ditemukan pada *E. coli* patogen dan 41,18% (14/34) pada *E. coli* non patogen. Berdasarkan patogen-non patogen didapatkan bahwa sebanyak 28,99% (20/69) *E. coli* patogen ternyata resistan terhadap kolistin dan dari isolat non patogen didapatkan 15,56% (14/90) resistan terhadap kolistin (Tabel 3). Jumlah *E. coli* resistan kolistin berdasarkan asal provinsi, paling banyak ditemukan pada isolat *E. coli* yang berasal dari Banten yaitu 72,22% (13/18), Sumatera Utara 55,56% (10/18), dan Jawa Barat 25,00% (9/36). Isolat *E. coli* resistan kolistin tidak ditemukan dari Provinsi Lampung dan Jawa Tengah.

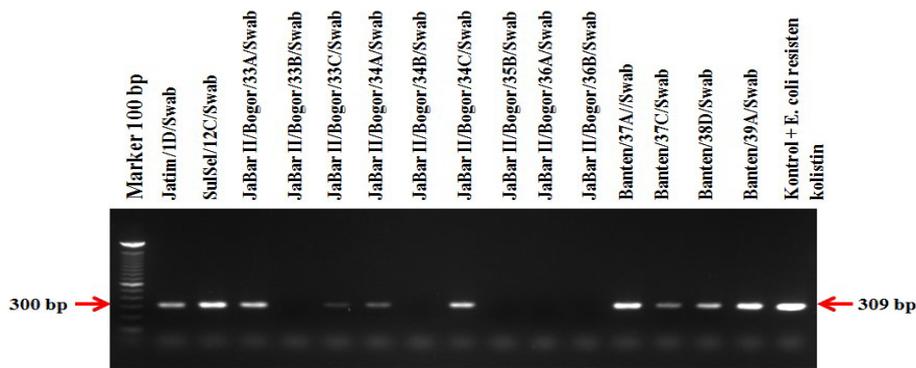
Bakteri *E. coli* resistan kolistin selanjutnya dideteksi keberadaan gen penyandi resistansi terhadap kolistin yaitu gen *mcr-1* yang tersaji pada Tabel 3 dan Gambar 1-3. Hasil deteksi gen *mcr-1* dari 7 provinsi dengan total 34 isolat *E. coli* resistan kolistin diperoleh sebesar 73,51% (25/34) yaitu ditemukan 25 isolat *E. coli* positif memiliki gen *mcr-1* dan 9 isolat lainnya negatif gen *mcr-1*. Hal ini menunjukkan keterkaitan genotip *mcr-1* dan fenotip resistan kolistin yang kuat. Dari hasil uji resistansi dan deteksi gen *mcr-1* didapatkan prevalensi *E. coli* resistan kolistin positif *mcr-1* adalah 15,72% (CI 95%; CL 10,88-22,18%). Deteksi gen *mcr-1* menggunakan metode PCR yang menunjukkan

hasil amplifikasi gen *mcr-1* dengan panjang amplicon 309 bp (Gambar 1-3).

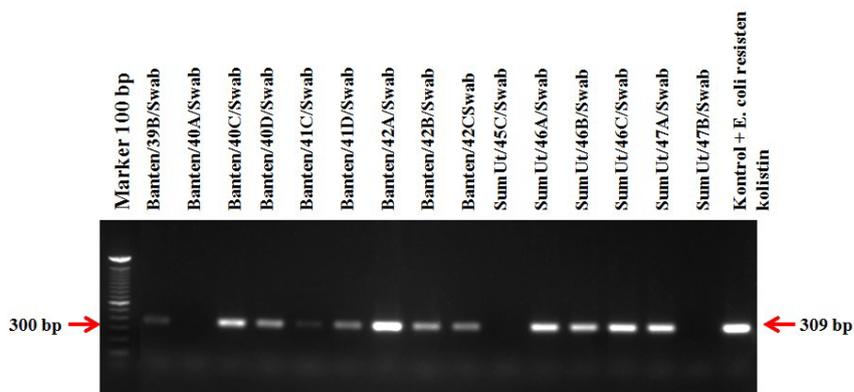
Antibiotik kolistin sejak tahun 1959 digunakan untuk mengobati infeksi bakteri Gram negatif pada manusia. Namun, karena kolistin memiliki efek samping yaitu bersifat toksik terhadap saraf (neurotoksik) dan ginjal (nephrotoksik) sehingga penggunaannya di manusia mulai ditinggalkan dan diganti dengan antibiotik yang lebih aman dan efektif. Beberapa tahun terakhir ini banyak muncul resistansi atau berkurangnya efikasi antibiotika golongan β -laktam, aminoglikosida, atau kuinolon tidak efektif menyebabkan kolistin digunakan kembali dan menjadi obat pilihan terakhir untuk pengobatan infeksi *Multi Drugs Resistansi* bakteri Gram negatif⁽²⁰⁾. Kolistin adalah antibiotik bersifat bakterisidal, memiliki spektrum sempit yang sangat efektif untuk membunuh bakteri Gram negatif yaitu sebagian besar *Enterobacteriaceae* termasuk *E. coli*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Klebsiella*⁽³³⁾. Kolistin sulfat sebagai obat pilihan terakhir untuk pengobatan infeksi oleh bakteri Gram negatif lain yang multiresistan seperti *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacteriaceae* multi resistan karbapenemase^(17, 8,11,29).

Tabel 3 Hasil Uji *E. coli* resistan kolistin dan positif memiliki gen *mcr-1*

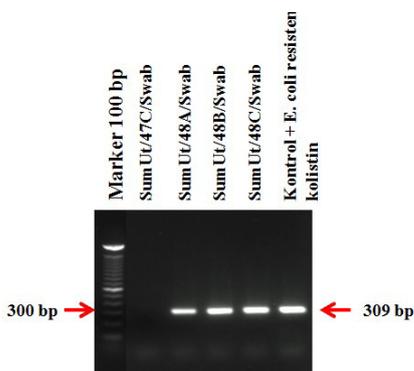
Provinsi	<i>E. coli</i> non patogen			<i>E. coli</i> Patogen			Persentase <i>E. coli</i> resistan	Persentase <i>E. coli</i> resistan positif <i>mcr1</i>
	Jumlah isolat	Jumlah resistan	Positif <i>mcr-1</i>	Jumlah isolat	Jumlah resistan	Positif <i>mcr1</i>		
Sumatera Utara	9	5	3	9	5	4	55,55%	38,88%
Lampung	9	0	0	9	0	0	0%	0 %
Banten	7	6	5	11	7	7	72,22%	66,66%
Jawa Barat	23	1	0	13	8	4	25,00%	11,11%
Jawa Tengah	6	0	0	12	0	0	0%	0%
Jawa Timur	18	1	1	6	0	0	4,16%	4,16%
Sulawesi Selatan	18	1	1	9	0	0	3.70%	3.70%
Total	90	14	10	69	20	15		
Persentase	90/159 (56,60%)	14/90 (15,56%)	10/14 (71,42%)	69/159 (43,40%)	20/69 (28,99%)	15/20 (75,00%)	34/159 (21,38%)	25/159 (15,72%)



Gambar 1 Amplifikasi gen *mcr-1* (309 bp) penyandi resistansi kolistin pada plasmid *E. coli* (n=15). Sebanyak 10 isolat *E. coli* yang berasal dari usap kloaka menunjukkan hasil positif *mcr-1* dan 5 isolat menunjukkan hasil negatif *mcr-1*. Kontrol positif: *E. coli* resistan kolistin memiliki gen penyandi resistansi *mcr-1* (309 bp).



Gambar 2 Amplifikasi gen *mcr-1* (309 bp) penyandi resistansi kolistin pada plasmid *E. coli* (n=15). Sebanyak 12 isolat *E. coli* yang berasal dari usap kloaka menunjukkan hasil positif *mcr-1* dan 3 isolat menunjukkan hasil negatif *mcr-1*. Kontrol positif: *E. coli* resistan kolistin memiliki gen penyandi resistansi *mcr-1* (309 bp).



Gambar 3 Amplifikasi gen *mcr-1* (309 bp) penyandi resistansi kolistin pada plasmid *E. coli* (n=4). Sebanyak 3 isolat *E. coli* yang berasal dari usap kloaka menunjukkan hasil positif *mcr-1* dan 1 isolat menunjukkan hasil negatif *mcr-1*. Kontrol positif: *E. coli* resistan kolistin memiliki gen penyandi resistansi *mcr-1* (309 bp).

Kolistin yang bersifat kationik akan berinteraksi dan berikatan dengan lipopolisakarida bagian hidrofobik dari lipid A yang bermuatan anionik sehingga merusak kestabilan membran sel dan menyebabkan isi sel bakteri keluar dan bakteri menjadi mati⁽³⁰⁾. Penggunaan kolistin di bidang kedokteran hewan banyak digunakan untuk pencegahan, pengobatan, metafilaksis, dan meningkatkan pertumbuhan^(15,37). Kolistin sering ditambahkan pada pakan dengan dosis rendah dan digunakan sebagai *growth promoter* di beberapa negara yang penggunaannya diizinkan⁽²¹⁾. Pada babi dan sapi, kolistin terutama digunakan untuk mengendalikan infeksi enterik yang disebabkan oleh *E. coli* dan *Salmonella*^(8, 37).

Perkembangan resistansi mikroba menjadi proses yang kompleks karena salah satunya berhubungan dengan keberadaan gen penyandi resistansi yang ditemukan di dalam material genetik pada plasmid atau kromosom. Integron adalah genetik material yang bertanggung jawab menangkap gen resistan dan menyebarkannya melalui *genetic mobile elements* seperti transposon dan plasmid. Keberadaan integron dapat dideteksi melalui amplifikasi gen *integrase (intl1, intl2, intl3)*⁽²⁾.

Gen *mcr-1* dilaporkan pertama kali oleh Liu *et al.* (2016) yang menemukan gen tersebut dari *E. coli* yang diisolasi tahun 2012 - 2014 di Cina, isolat *E. coli* berasal dari sampel daging mentah sebesar 15% (78/523), dari sampel hewan 21% (166/804), dan dari sampel pasien rawat inap 1% (16/1322)⁽²⁵⁾. Analisis retrospektif menunjukkan gen *mcr-1* telah bersirkulasi sejak tahun 1980-an dan isolat paling awal berasal dari ayam⁽³⁹⁾. Gen *mcr-1* terletak pada plasmid yang mengkode enzim kelompok *phosphoethanolamine transferase* (pEtN). Ekspresi enzim ini pada *E. coli* akan menghasilkan penambahan molekul pEtN pada lipid A sehingga kolistin tidak dapat berikatan pada lipid A dan tidak dapat masuk ke dalam sel bakteri sehingga bakteri menjadi resistan⁽²⁵⁾.

Beberapa data penelitian menunjukkan gen *mcr-1* banyak bersirkulasi pada isolat resistan

kolistin yang berasal dari sampel unggas. Namun, gen *mcr-1* tidak selalu ditemukan pada isolat yang resistan kolistin secara fenotip, karena resistansi kolistin dapat juga terjadi karena adanya *novel mcr-like* gen atau resistansi jalur kromosom yang mungkin terlibat^(15,36). Hal ini ditemukan dari hasil pengkajian ini yaitu terdapat 9 isolat *E. coli* yang resistan kolistin secara fenotip namun tidak ditemukan gen *mcr-1*. Resistansi terhadap kolistin pada sebagian besar bakteri Gram negatif melalui jalur kromosom yang melibatkan penambahan molekul 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) dan pEtN pada lipid A. Penambahan molekul tersebut menurunkan afinitas lipid A sehingga kolistin tidak dapat berikatan dengan lipid A dan tidak dapat merusak membran sehingga bakteri menjadi resistan⁽³⁰⁾. Mekanisme resistansi lainnya melalui modifikasi spesifik pada porin membran luar, meningkatkan pengaturan MexAB-OprM dan akhirnya terjadi ekspresi berlebih pada sistem pompa *efflux* sehingga kolistin dikeluarkan dari sel bakteri⁽³¹⁾.

Resistansi terhadap kolistin dapat juga terjadi tanpa paparan antibiotik kolistin seperti yang ditemukan pada isolat pasien dari Huashan Hospital di Cina dan semua isolat berasal dari pasien yang tidak mendapatkan pengobatan antibiotik kolistin. Pada 68 isolat *Klebsiella pneumonia* ditemukan 3 isolat *K. pneumonia* yang resistan kolistin dan dari 14 isolat *Enterobacteriaceae* ditemukan 1 isolat *Enterobacter cloacae* resistan terhadap kolistin⁽⁹⁾. Gen *mcr-1* telah ditemukan secara luas di dunia, pada bakteri *Salmonella* yang resistan kolistin, *mcr-1* ditemukan sebanyak 22,7% (5/22) di Cina, Italia 15,4% (2/13), dan Belanda 20,8% (11/53)^(7,24,27). Adapun pada penelitian Lettini *et al.* (2016), isolat *Salmonella* resistan kolistin yang didapatkan dari peternakan unggas dan babi di Vietnam tidak ditemukan adanya gen *mcr-1*.

Wang *et al.* (2018), melakukan kajian kompilasi terhadap 457 data global 2008-2016 dari isolat positif memiliki gen *mcr-1* dari 31 negara, dengan rincian berikut: 110 data *whole-genome sequencing* (WGS) dari Cina, 195 data isolat dari publikasi yang sekuennya terdapat

di NCBI GenBank, dan 152 sekuen dari NCBI *Short Read Archive* (SRA). Hasilnya ditemukan jumlah sampel positif *mcr-1* tertinggi yaitu 222 sampel berasal dari Cina dengan 45% sampel berasal dari Provinsi Shandong, 58 sampel dari Vietnam, dan 25 sampel dari Jerman. Isolat yang positif *mcr-1* tertinggi berasal dari bakteri *E. coli* (411), *Salmonella enterica* (29), *Klebsiella pneumonia* (8), *Escherichia fergusonii* (2), *Kluyvera ascorbate* (2), *Citrobacter braakii* (2), *Cronobacter sakazakii*(1), dan *Klebsiella aerogenes* (1). Informasi terkait sumber sampel diperoleh 222 berasal dari hewan, 108 dari manusia, dan 30 sampel lingkungan⁽⁴³⁾.

Adanya gen penyandi resistansi *mcr-1* pada bakteri *E. coli* resistan kolistin yang berasal dari sampel broiler hidup (usap kloaka) pada kajian ini serta ditemukannya gen *mcr-1* dari hewan dan manusia oleh Liu *et al.* (2016), menimbulkan kekhawatiran akan semakin sulit penanganan kasus infeksi bakteri Gram negatif pada manusia⁽²⁵⁾. Menurut Yi *et al.*(2017) hingga sekarang *E. coli* merupakan bakteri pembawa utama gen *mcr-1* yang merupakan gen penyandi resistansi antibiotik kolistin yang mampu mentransfer materi genetik tersebut secara horizontal antar spesies bakteri⁽⁴⁶⁾.

Keberadaan *E. coli* patogen resistan antibiotik dari sampel feses dan tanah kemungkinan dapat mengkontaminasi rantai makanan dan menjadi sumber bahaya bagi kesehatan masyarakat, bakteri yang resistan dapat secara berkelanjutan mencemari lingkungan melalui feses dan dapat menyebabkan infeksi serius bakteri resistan pada manusia⁽³²⁾. Bakteri *E. coli* resistan dapat juga menyebar ke manusia melalui kontak langsung manusia dengan hewan terinfeksi dan *E. coli* resistan dapat berperan sebagai “pemindah” gen resistan terhadap bakteri lainnya⁽¹⁾.

Hasil deteksi gen *mcr-1* dari 7 provinsi diperoleh keberadaan gen *mcr-1* pada isolat *E. coli* resistan kolistin sebesar 73,53% (25/34). Persentase tertinggi ditemukan *E. coli* resistan kolistin dan memiliki gen *mcr-1* dari Provinsi Banten (66,66%), berikutnya Sumatera Utara (38,88%), Jawa Barat (11,11%), Jawa Timur

(4,16%), Sulawesi Selatan (3,70%), sedangkan dari Provinsi Lampung dan Jawa Tengah negatif isolat *E. coli* resistan kolistin dan negatif gen *mcr-1*. Tingginya nilai keterkaitan keberadaan gen resistan *mcr-1* ini menunjukkan hubungan yang linier antara hasil uji resistansi secara fenotip dan keberadaan elemen genetik yaitu gen penyandi resistansi *mcr-1* yang terekspresi. Hasil kajian ini secara keseluruhan memberikan gambaran bahwa hewan pada peternakan dapat menjadi reservoir/sumber penularan bakteri resistan melalui perpindahan gen resistan atau terinfeksi *E. coli* resistan ke hewan, manusia, bakteri lain dan lingkungan. Dari data ini menunjukkan bahwa keputusan pemerintah Indonesia untuk melarang peredaran kolistin untuk digunakan pada hewan per Juli 2020 sudah tepat. Namun demikian, surveilans resistansi kolistin masih perlu dilanjutkan untuk melihat efektifitas peraturan ini dan melihat titik-titik kritis lainnya guna mencegah penyebaran dan perbanyakkan *E. coli* resistan kolistin dari hewan ke manusia. Serta perlunya pengawasan obat hewan dalam rangka pemastian bahwa sudah tidak ada lagi kolistin yang digunakan di hewan produksi juga masih perlu dilakukan,

KESIMPULAN

Hasil isolasi dari sampel usap kloaka diperoleh 159 isolat *E. coli* dan dari sampel pakan dan air baku tidak ditemukan isolat *E. coli*. Hasil uji patogenitas diperoleh 69 (43,40%) adalah *E. coli* patogen dan 90 (56,60%) adalah *E. coli* non patogen. Prevalensi *E. coli* resistan kolistin ditemukan cukup tinggi yaitu 21,38% (CI 95%; CL 15,73-28,39%) dan prevalensi *E. coli* resistan kolistin positif *mcr-1* adalah 15,72% (CI 95%; CL 10,88-22,18%). Keterkaitan genotipik *mcr-1* dan fenotipik *E. coli* resistan kolistin cukup tinggi, hal ini ditunjukkan 73,53% *E. coli* resistan kolistin memiliki gen *mcr-1*. Persentase resistansi kolistin dan keberadaan gen *mcr-1* berdasarkan lokasi tertinggi ditemukan dari Provinsi Banten, berikutnya Sumatera Utara, dan Jawa Barat. Keberadaan gen *mcr-1* yang terdapat di plasmid memberikan peluang terjadinya penyebaran

resistansi terhadap bakteri komensal dan bakteri patogen lainnya. Penyebaran resistansi ini dapat menyebabkan infeksi semakin sulit diobati dan periode infeksi semakin panjang yang akhirnya akan menurunkan ketahanan dan produktivitas ternak. Beberapa upaya untuk menurunkan penyebaran dan dampak resistansi melalui peningkatan biosekuriti dan menerapkan management peternakan yang baik, menerapkan higiene dan sanitasi saat mengolah bahan pangan asal hewan serta menggunakan antibiotik hanya untuk tindakan terapi.

SARAN

Kegiatan pengkajian ini masih membutuhkan kegiatan lanjutan dengan lingkup kajian/ penelitian yang lebih luas lagi yaitu kajian dengan jenis bakteri atau agent biologi yang berbeda, dan golongan antibiotik, sumber sampel serta gen penyandi resistan yang berbeda sehingga Indonesia memiliki data yang komprehensif khususnya di bidang Kesehatan Hewan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Akond M. 2009. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Am J Environ Sci.* 5(1):47–52. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2009.47.52>.
2. Awad A, Arafat N, Elhadidy M. 2016. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 15(1):59. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0174-9>.
3. Bahera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, Farooque K, Sharma VMisra MC. 2010. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. *Int J Infect Dis.* 14:596-601.
4. Berkhoff, H. A. and A. C. Vinal. 1985. Congo Red Medium to Distinguish Between Invasive and Non invasive *Escherichia coli* Pathogenic for Poultry. *Avian Disease*30(1):117-121.
5. Bisping W, Amtsberg GA. 1988. Color Atlas for The Diagnosis of Bacterial Pathogen in Animal. Berlin: *Paul Parey Scientific Publishers.* Pp: 160 – 168.
6. Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC. 2003. Virulence Factors and Clonal Relationship Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *J Infect Immun.* 71:4175 – 4177.
7. Carnevali C, Morganti M, Scaltriti E, Bolzoni L, Pongolini S, Casadei G. 2016. Occurrence of *mcr-1* Colistin-Resistant *Salmonella* isolates recovered from human and animals in Italy, 2012-2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:7532–7534.
8. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Navas AL, Mackay D *et al.* 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents.* 46:297–306.
9. Chen S, Hu F, Zhang X, Xu X, Liu Y, Zhu D, Wang H. 2011. Independent emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates without colistin treatment. *J Clin Microbiol.* 49:4022–4023.
10. [CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. M100S: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 26th ed. Wayne (PA, US): CLSI. Pp: 52-54.
11. Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. 2009. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Food Safety CID* 49:132-141.
12. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. 2015. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among

- carbapanem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(8):4625-30.
13. 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.
 14. [EUCAST] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1.
 15. [EMA] European Medicines Agency. 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. 30 Churchill Place. Canary Wharf London E14 5EU. United Kingdom (UK). Terdapat pada https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en.pdf. [diunduh 13 Februari 2019]
 16. Ewings WH. 1986. Identification of Enterobacteriaceae 4th Ed. Elsevier, New York.
 17. Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin the Revival of Polymixins for the Management of Multidrug-Resistant Gram Negative Bacterial Infection. *Clin Infect Dis.* 40:1333-1341.
 18. Gjessing KM and Berkhoff HA. 1988. Experimental Reproduction of Airsacculitis and Septicemia by Aerosol Exposure of 1-Day-Old Chicks Using Congo Red Positive *Escherichia coli*. *Avian Diseses* 30(6):473-478.
 19. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichiacoli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 140: 360–370. 2.
 20. Kasiakou SK, Michalopoulos A, Soteriades ES, Samonis G, Sermaides GJ, Falagas ME. 2005. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3136–46.
 21. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, Madec JY, Jouy E. 2013. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe. *Elsevier* 42(4):379-383. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012. Epub 2013 Sep 26.
 22. Knobl T, Gomes TAT, Veira MAM, Bottino JA, Ferreira AJP. 2006. Occurrence of adhesin encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeder with salpingitis and chick with omphalitis. *Braz J Microbiol.* 37.
 23. Lettini AA, Vo Than T, Marafin E, Longo A, Antonello K, Zavagnin P, Barco L, Mancin M, Cibir V, Morini M, Dang TS, Thi MN, Trung TP, Le H, L, Duc LN, Ricci AT. 2016. Distribution of *Salmonella* serovars and antimicrobial susceptibility from poultry and swine farms in central Vietnam. *Zoonoses Public Health.* 63:569–576.
 24. Li XP, Fang LX, Song JQ, Xia J, Huo W, Fang JT, Liao XP, Liu YH, Feng Y, Sun J. 2016. Clonal spread of *mcr-1* in PMQR-carrying ST34 *Salmonella* isolates from animals in China. *Sci Rep.* 6:38511. doi:10.1038/srep38511.
 25. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X et al. 2016. Emergence of plasmid mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human being in China: A microbiological and molecular biology study. *Lancet Infect. Dis.* 16:161–168.
 26. Lutful Kabir SM. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int J Environ Res Public Health* 7(1):89–114. <https://doi.org/10.3390/ijerph7010089>.
 27. [MARAN] Monitoring of Antimicrobial

- Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in. 2016. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in The Netherlands in 2015. Bergen: Dutch Foundation of the Working Party on Antibiotic Policy (USAP). Terdapat pada <http://www.usap.nl>. [diunduh 25 Agustus 2020].
28. Morales AS, Araujo JF, Moura Gomes VT, Costa ATR, Rodrigue DP, Ferreira TSP, ... Moreno AM. 2012. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* strains isolated from swine in Brazil. *Sci World J*: 109795.
29. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. 2016. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 22 (6):1038-1043.
30. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers Microbiol*. 5(249). doi: 10.3389/fmicb.2014.00643.
31. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *J Mol Microbiol*. 68:223-240.
32. Parul S, Bist B, Sharma B, Jain U. 2014. Virulence associated factors and antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from cattle and soil. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916. Terdapat pada www.veterinaryworld.org/Vol.7/May-2014/20.pdf. doi: 10.14202/vetworld.2014.369-372. [diunduh 30 September 2020].
33. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *J Clin Microbiol Rev*. 30:557-596.
34. Palupi MF, Wibawan IWT, Sudarnika E, Maheshwari H, Darusman HS. 2019. Prevalence of *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli* along broiler meat supply chain in Indonesia. *Biotropia* (26)2:143-153. DOI: <http://dx.doi.org/10.11598/btb.2019.26.2.1054>
35. Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL, Domínguez L. 2016. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *J Res in Vet Sci*. 105:134-135.
36. Raghavan V. 1997. The concept of quality control to improve feed quality for poultry production. Asia Focus Proceeding VIV Seminars on Poultry and Pig Production. *Misset International*. Pp:57-59.
37. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. 2016. Colistin in pig production: chemistry, mechanism antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers Microbiol*. 7(1789). doi: 10.3389/fmicb.2016.01789.
38. Ronsengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ. 2009. Association between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes and virulence genes of faecal *E. coli* isolates of healthy grown finish pigs. *Applied Environ. Microb*. 75:1373-1380.
39. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. 2016. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infect Dis*. 16(293). doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X.
40. [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2008. Metode Pengujian Cemaran Mikroba dalam Daging, Telur dan Susu serta Hasil Olahannya. SNI No. 2897:2008. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
41. Suwito W. 2010. Monitoring *Salmonella sp* dan *Escherichia coli* dalam bahan pakan ternak. *Buletin Peternakan* 34(3):165-168.
42. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, Lammens C, Zarkotou O, Pournaras S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2018. Evaluation of colistin stability in agar

- and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 37:345-53.
43. Wang R, Lucy van Dorp, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, Jin L, Zhang Q, Liu Y, Rieux A, Schneiders TD, Weinert LA, Iqbal Z, Didelot X, Wang H, Balloux F. 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature Comunication* 9:1179. doi: 10.1038/s41467-018-03205-z.
44. Wooley RE, Gibbs PS, Brown TP, Maurer JJ. 2000. Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis.* 44:318 – 324.
45. [OIE] World Organization for Animal Health. 2016. Terrestrial animal health code 25th ed. Paris (FR): OIE.
46. Yi L, Wang J, Gao Y, Liu Y, Doi Y, Wu R, Zeng Z, Liang Z, Liu JH. 2017. Mcr-1 Harboring Salmonella enteric Serovar Typhimurium Sequence Type 34 in Pigs. *China. Emerg Infect Dis.* 2392:291-295.

VALIDASI METODE UJI KADAR SEDIAAN DIKLAZURIL SERBUK TUNGGAL DENGAN PELARUT SODIUM ASETAT TRIHIDRAT DALAM METANOL MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis

Maria Fatima Palupi, Siti Khomariyah, Eli Nugraha, Emi Rusmiati, Nafisah Idrishanty

Unit Uji Farmasetik dan Premiks
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340
Email: lupi_ima@yahoo.co.id

ABSTRAK

Validasi metode merupakan suatu keharusan dalam pengembangan metode untuk memastikan bahwa metode yang digunakan memberikan hasil yang valid. Tujuan pengkajian ini adalah melakukan validasi metode uji kadar sediaan diklazuril serbuk tunggal dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol. Parameter validasi yang diuji adalah presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, dan spesifisitas. Hasil presisi, akurasi, linearitas, spesifisitas dinyatakan memenuhi persyaratan jika: (1) untuk presisi nilai koefisien variasi (*coefficient of variation/CV*) pengujian < CV Horwitz dari metode; (2) akurasi dinyatakan baik jika nilai *recovery* < 5% atau rentang perolehan kembali 90-107%; (3) nilai regresi linearitas (*r*) > 0,99; dan (4) dinyatakan spesifik apabila kromatogram hasil uji zat selain diklazuril berbeda dengan bentuk kromatogram diklazuril. Hasil uji presisi menunjukkan bahwa metode ini memberikan presisi yang baik dengan nilai CV yang didapatkan 3,06%. Penilaian akurasi ditentukan dengan mendapatkan selisih perolehan kembali (*recovery*) dan didapatkan nilai *recovery* 2,94%. Uji akurasi juga dilakukan dengan tiga konsentrasi *working* standar yang berbeda (5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm) dan didapatkan nilai perolehan kembali 97,69% serta CV 2,07%. Linearitas metode ini diperoleh nilai regresi 0,99. Hasil uji spesifikasi metode dengan menggunakan toltrazuril sebagai pengecoh, menunjukkan hasil kromatogram toltrazuril berbeda dengan diklazuril. Batas deteksi metode didapatkan 0,480 ppm dan batas kuantifikasi 1,601 ppm. Hasil pengkajian ini menunjukkan bahwa validasi metode uji kadar diklazuril dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol memberikan hasil presisi, akurasi, linearitas yang baik, serta metode ini bisa spesifik membedakan diklazuril dengan zat lain, memiliki batas deteksi 0,480 ppm, dan batas kuantitasi 1,601 ppm. Oleh sebab itu dapat disimpulkan metode ini dapat digunakan untuk menguji kadar sediaan diklazuril serbuk tunggal dan pengujian rutinitas terhadap mutu sediaan diklazuril serbuk tunggal karena memiliki validitas yang baik.

Kata kunci: metode, validasi, kadar, diklazuril

ABSTRACT

*Method validation is a necessity in developing methods to ensure that the methods used provide valid results. The purpose of this study was to validate the test method for the content of single diclazuril powder preparations using a UV-Vis spectrophotometer with solvent of sodium acetate trihydrate in methanol. Validation parameters tested were precision, accuracy, linearity, limit of detection, the limit of quantification, and specificity. The results of precision, accuracy, linearity, specificity are stated to meet the requirements if: (1) for the precision of the coefficient of variation (CV) testing < CV Horwitz method; (2) accuracy is stated as good if the recovery value is <5% or the recovery range is 90-107%; (3) linearity regression value (*r*) > 0.99; and (4) is stated specifically if test results showed the chromatogram of other substances differs from chromatogram of diclazuril. The precision test results showed that this method produced good precision with a CV value of 3.06%. Accuracy assessment was determined by obtaining different recovery values and resulted a recovery value of 2.94%. Accuracy tests were performed with three different working standard concentrations (5 ppm, 10 ppm, and 15 ppm) and obtained a recovery value of 97.79% also CV of 2.07%. The linearity of this method obtained a regression value of 0.99. The results of the specification test using toltrazuril showed different chromatogram results than diclazuril. The limit of detection was 0.480 ppm and the limit of quantification limit was 1.601 ppm. This study indicated that the validation method for the content of diclazuril powder by spectrophotometer UV-Vis dissolved in the solvent of sodium acetate trihydrate in methanol generated good precision, accuracy, linearity, and this method can specifically distinguish diclazuril from other substances, has a limit of detection of 0.480 ppm, and a limit of quantification of 1.601 ppm. As this method has a good validity, therefore, it can be used to test the content of single diclazuril powder preparations and routine testing of the quality of single diclazuril powder preparations.*

Keywords: method, validation, content, diclazuril

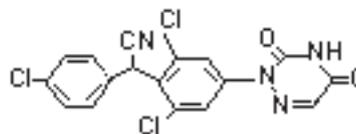
PENDAHULUAN

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) mempunyai tugas utama antara lain untuk melakukan pengujian mutu obat hewan dan pengembangan metode. Dua tugas ini saling berkorelasi satu sama lain. Sejalan dengan peningkatan jumlah dan jenis obat hewan yang masuk untuk di uji di BBPMSOH maka diperlukan pengembangan metode uji yang cepat dan memberikan hasil yang valid. Sebagai laboratorium uji yang mengacu pada ISO 17025:2017, maka metode yang dikembangkan di BBPMSOH harus divalidasi terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai uji rutin di laboratorium.

Validasi metode adalah proses yang ditetapkan melalui kajian laboratorium bahwa karakteristik kinerja metode tersebut telah memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya^(7,10). Menurut Hadi (2017) tujuan dari validasi metoda adalah untuk: (1) mendapatkan informasi penting dalam menilai kemampuan sekaligus keterbatasan dari suatu penerapan metode pengujian dan/atau metode kalibrasi, (2) mengidentifikasi aspek kritis dari suatu metode yang harus dikontrol dan dipelihara secara hati-hati, (3) mengetahui sejauh mana penyimpangan yang tidak dapat dihindari dari suatu metode, dan (4) memperkirakan dengan pasti tingkat kepercayaan yang dihasilkan oleh suatu metode pengujian. Adapun parameter atau karakteristik kinerja analitik yang digunakan dalam validasi metode adalah akurasi, presisi, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, linearitas, rentang, dan ketegaran^(8,10). Pemilihan parameter validasi sangat tergantung dari jenis metode pengujian.

Salah satu obat hewan yang diuji kadarnya di Unit Uji Farmasetik dan Premiks, BBPMSOH adalah diklazuril. Diklazuril merupakan antikoksidia derivatif *benzeneacetonitrile*. Rumus kimia diklazuril adalah *benzeneacetonitrile 2,6-dichloro-a-(4-chlorophenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl)* dengan gambar struktur kimia sebagaimana Gambar 1. Diklazuril

adalah antikoksidia yang banyak digunakan pada unggas seperti broiler, kalkun, selain itu diklazuril juga digunakan di domba^(1,5,12).



Gambar 1 Struktur kimia diklazuril

Menurut Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi X⁽⁴⁾ terdapat sepuluh produk obat hewan yang mengandung diklazuril. Semua produk obat hewan guna mendapatkan ijin edar atau nomor registrasi ataupun untuk registrasi ulang harus diuji mutunya di BBPMSOH. Uji mutu ini meliputi uji umum dan khusus. Salah satu uji khusus yang dilakukan untuk obat hewan yang mengandung diklazuril adalah uji kesesuaian kadar sebagaimana yang dicantumkan di label atau pada dokumen registrasi pendaftaran obat hewan di Lampiran A. Uji kadar sediaan diklazuril serbuk tunggal menurut Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid 2 Edisi IV dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)⁽³⁾. Untuk uji menggunakan KCKT diperlukan beberapa bahan seperti dimetilformamid untuk pelarut standar dan sampel, adapun fase gerak diperlukan ammonium format, asam format anhidrat, asetonitril, dan air. Mengingat banyaknya bahan yang digunakan dan perlunya adanya alternatif metode uji kadar jika kolom atau alat KCKT mengalami kerusakan, maka diperlukan suatu metode lain yang dapat digunakan untuk menguji kadar diklazuril.

Beberapa pertimbangan yang digunakan untuk mengembangkan metoda adalah penggunaan bahan uji yang lebih sedikit, waktu pengujian lebih cepat, bahan uji yang digunakan lebih aman bagi penguji, dan lebih mudah dikerjakan. Pengkajian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode uji kadar diklazuril serbuk tunggal dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

MATERI DAN METODE

Validasi metode dilaksanakan di Unit Uji Farmasetik dan Premiks-BBPMSOH. Paramater validasi yang diukur adalah akurasi, presisi, linearitas, spesifikasi, limit deteksi, dan limit kuantitasi. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), neraca analitik (Labror), labu ukur 100 mL, labu ukur 50 mL, sentrifus (Kubota), ultrasonikator (Elma), pipet ukur 2 mL, dan cuvet. Bahan yang digunakan adalah *working* standar diklazuril (*USP Ref. Standard, USA*), sampel obat hewan diklazuril serbuk tunggal dengan komposisi 5 mg/g, metanol p.a. (Merck, *Germany*), dan sodium asetat trihidrat (Merck, *Germany*). Larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol dibuat dengan cara melarutkan 600 mg sodium asetat trihidrat dalam metanol p.a. 100 mL.

1. Metode uji yang divalidasi

Sampel obat hewan yang mengandung diklazuril ditimbang seksama setara dengan diklazuril 2,5 mg kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Lima puluh mL larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol dimasukkan ke labu ukur 100 mL, dikocok hingga larut. Sampel dipastikan dulu larut dalam cairan tersebut baru kemudian ditambahkan metanol p.a. hingga 100 mL. Larutan diultrasonikasi selama 15 menit guna memastikan semua sampel terlarut sempurna kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 2 mL filtrat diambil, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, dan diencerkan dengan metanol p.a. hingga 50 mL sehingga didapatkan konsentrasi akhir diklazuril 10 ppm.

Adapun untuk perlakuan standar diklazuril adalah sebagai berikut sebanyak 12,5 mg standar diklazuril dimasukkan dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan 25 mL larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol. Larutan dikocok hingga standar diklazuril terlarut dan kemudian ditambahkan metanol p.a. hingga 50 mL. Jika belum terlarut sempurna, larutan diultrasonikasi selama 15 menit. Sebanyak 2 mL larutan

standar diambil, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan metanol p.a. hingga 50 mL sehingga mendapatkan konsentrasi akhir standar diklazuril adalah 10 ppm. Lalu serapan sampel dan standar diklazuril diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum antara 274,5 – 278,5 nm dan sebagai blanko digunakan metanol p.a. Diklazuril pada sampel dinyatakan identik dengan standar apabila memiliki bentuk kurva kromatogram yang sama serta selisih panjang gelombang maksimum antara sampel dan standar tidak boleh lebih dari 2 nm⁽¹³⁾. Kadar diklazuril dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Perhitungan kadar diklazuril:

$$\frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standar}}} \times \frac{C_{\text{standar}}}{C_{\text{sampel}}} \times 100\% \text{ (rumus 1)}$$

Keterangan:

A = serapan atau absorbansi pada panjang gelombang

C = konsentrasi akhir kandungan diklazuril yang diukur

*= atau dikalikan dengan tingkat kemurnian standar diklazuril yang digunakan

2. Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan dua dari metode berikut:

2.1 Dalam 2,5 g laktosa *dispike* dengan 12,5 mg *working standard* diklazuril kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan 25 mL larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol. Larutan dikocok hingga terlarut kemudian ditambahkan metanol p.a. hingga 50 mL. Larutan kemudian diultrasonikasi selama 15 menit. Sebanyak 2 mL larutan standar diambil, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan metanol p.a. hingga 50 mL. Untuk standar diperlakukan sebagaimana metode yang disampaikan pada Materi dan Metode bagian 1. Serapan hasil *spike* dan standar diklazuril diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum antara 274,5 – 278,5

nm dan sebagai blanko digunakan metanol p.a. Pengujian kadar perolehan kembali analit diklazuril yang *dispike* ini dilakukan sebanyak 6 kali. Hitung rata-rata dari perolehan *recovery spike working standard* diklazuril dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{Xd}{Xo} \times 100\% \quad (\text{rumus 2})$$

$$Xd = Xi - Xo \quad (\text{rumus 3})$$

Keterangan :

Xd = selisih kadar pada berbagai penentuan

X_i = hasil analisis

X_o = hasil yang sebenarnya

2.2 *Working standar* diklazuril dengan tiga konsentrasi yang berbeda (5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm) diuji dengan menggunakan metode yang akan divalidasi sebagaimana pada Materi dan Metode bagian 1. Masing-masing konsentrasi diuji ulang sebanyak tiga kali dan kemudian dicari rata-rata perolehan kembali. Metode uji ini dikatakan memiliki akurasi yang baik apabila memiliki nilai *recovery* < 5% dan nilai perolehan kembali berada antara 90 – 107% ^(2, 7).

3. Uji Presisi

Uji presisi metode dilakukan dengan menguji kadar diklazuril dalam sediaan sampel obat hewan serbuk tunggal yang mengandung diklazuril 5 mg/g. Pengujian dilakukan dengan metode yang divalidasi dan dilakukan pengulangan hingga 7 kali. Kemudian dihitung rata-rata, simpangan baku (*standard deviation/SD*), simpangan baku relatif (*relative standard deviation/RSD*), dan CV dari hasil pengujian. Hasil CV pengujian kemudian dibandingkan dengan nilai CV Horwitz pada 10 ppm.

Metode dinyatakan memiliki presisi yang baik jika (1) uji presisi dilakukan secara riptabilitas maka CV presisi pengujian

harus < CV Hortwitz atau (2) jika dilakukan secara riptabilitas CV presisi harus < 0,66 x CV Horwitz ^(7,9). CV Horwitz untuk 10 ppm adalah 11,31%, sehingga nilai 0,66 x CV Horwitz adalah 7,47%. Adapun rumus untuk menghitung, RSD, CV, dan CV Horwitz adalah sebagai berikut:

$$RSD = \frac{\delta}{x} \quad (\text{rumus 4})$$

$$CV = RSD \times 100\% \quad (\text{rumus 5})$$

$$CV \text{ (Horwitz)} = 2^{1-0.5\log C} \quad (\text{Rumus 6})$$

Keterangan:

σ = standar deviasi

x = rata-rata

C = konsentrasi sampel saat diukur (10 ppm)

4. Uji Linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan membuat kurva standar diklazuril menggunakan minimal 5 (lima) konsentrasi dengan rentang 80-120% dari konsentrasi yang digunakan untuk pengujian. Konsentrasi standar diklazuril yang digunakan yaitu 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, dan 12 ppm.

Serapan standar diklazuril diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum antara 274,5 – 278,5 nm dan sebagai blanko digunakan metanol p.a. Kemudian dilakukan perhitungan persamaan garis regresi antara konsentrasi dan serapan standar diklazuril untuk mendapatkan nilai koefisien korelasi (r) diklazuril. Linearitas r dinyatakan baik jika $r \geq 0,99$ ⁽²⁾. Nilai r didapatkan dengan rumus analisis regresi linier sebagai berikut:

$$y = a + bx \quad (\text{rumus 7})$$

Keterangan:

a = *intercept*

b = *slope*

x = serapan

5. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

Guna mendapatkan limit deteksi dan limit kuantitasi dari metode yang divalidasi maka dilakukan perhitungan secara statistik melalui garis regresi linear dari uji linearitas

dan serapan sampel dari hasil uji presisi. Rumus untuk menghitung limit deteksi dan limit kuantitasi adalah sebagai berikut:

$$\text{Limit deteksi} = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} \text{ (rumus 8)}$$

$$\text{Limit kuantitasi} = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b} \text{ (rumus 9)}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum(Y - y_i)^2}{n - 2} \text{ (rumus 10)}$$

Keterangan :

$S_{y/x}$ = standar deviasi respon analitik dari blanko

b = *slope* / kemiringan dari garis pada persamaan garis

Y = nilai area atau absorbansi pengukuran

y_i = nilai perhitungan kadar dalam rumus persamaan regresi ($y_i = bx + c$)

n = jumlah pengulangan

6. Uji Spesifisitas

Uji spesifisitas metode uji kadar diklazuril dilakukan dengan menggunakan pengecoh *working standard* toltrazuril. Dalam 2,5 g laktosa *dispike* dengan 12,5 mg *working standard* toltrazuril dan kemudian dilakukan pengujian kadar sebagaimana Materi dan Metode Bagian 1. Hasil uji diamati apakah ada perbedaan bentuk kromatogram dan panjang gelombang maksimum dari toltrazuril dibandingkan dengan diklazuril. Metode uji dinyatakan spesifik untuk uji kadar diklazuril apabila hasil kromatogram dan panjang gelombang maksimum toltrazuril berbeda dengan standar ataupun sampel diklazuril.

Tabel 1 Hasil *recovery working standard* diklazuril

Pengulangan ke:	% <i>recovery</i>
1	1,49
2	3,27
3	4,74
4	3,16
5	3,32
6	1,68
Rata-rata (%)	2,94

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya atau tingkat kedekatan antara hasil pengujian dengan prosedur yang sedang divalidasi terhadap nilai yang benar^(7, 10). Untuk mengetahui keakuratan suatu metode uji dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: (1) menggunakan bahan analit yang diketahui kemurniannya, (2) membandingkan hasil analisis dengan prosedur lain yang telah ditetapkan akurasinya, (3) penambahan standar dalam suatu rentang tertentu kedalam plasebo atau jika plasebo tidak didapatkan dapat menambahkannya ke suatu sediaan yang telah diketahui kadarnya, (4) menambahkan cemaran dalam jumlah tertentu kesediaan atau zat aktif, dan (5) menggunakan minimal sembilan penentuan dari tiga tingkat konsentrasi yang berbeda dalam rentang pengujian metode analisis tersebut dan masing-masing konsentrasi tiga kali penetapan^(2,8,10).

Dalam menguji akurasi dari metode ini dilakukan dua pengujian yaitu dengan menambahkan *working standard* diklazuril pada plasebo berupa laktosa serta dengan menguji kadar *working standard* diklazuril pada tiga konsentrasi yang berbeda masing-masing sebanyak tiga kali. Hasil *recovery* pengujian dengan penambahan atau *spike working standard* diklazuril yang dihitung dengan menggunakan rumus 2 tersaji dalam Tabel

Berdasarkan Tabel 1, hasil nilai *recovery* menunjukkan bahwa metode ini memiliki akurasi yang baik. Hal ini dapat dilihat dari semua keenam pengujian nilai *recovery* tidak ada yang berada lebih dari 5%. Adapun rata-rata *recovery* dari keenam pengujian tersebut adalah 2,94%. Oleh sebab itu, metode ini memiliki akurasi yang baik karena nilai presisi *recovery* < 5%.

Hasil uji akurasi dengan menggunakan tiga konsentrasi diklazuril yang diulang masing-masing tiga kali tersaji dalam Tabel 2. Berdasarkan hasil uji, diperoleh rata-rata perolehan kembali adalah 97,69%. Nilai perolehan kembali dinyatakan baik apabila nilai perolehan kembali berada dalam rentang 90-107%^(2,7). Persyaratan 90-107% ini disebabkan karena analit yang terukur berada dalam rentang 5-15 ppm, adapun dalam pengujian rutin metode ini menggunakan konsentrasi akhir analit yang diukur adalah 10 ppm. Oleh sebab itu, berdasarkan uji perolehan kembali dengan menggunakan tiga konsentrasi yang berbeda, maka akurasi metode uji kadar diklazuril dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol memiliki akurasi yang baik.

Berdasarkan hasil pengulangan pengujian untuk uji akurasi dengan menggunakan tiga konsentrasi didapatkan nilai CV akurasi 2,07%. Nilai ini lebih kecil dari nilai CV Horwitz metode

uji yang divalidasi. Dengan menggunakan rumus nomor 6 didapatkan nilai CV Horwitz untuk metode uji ini adalah 11,31%. Berkenaan bahwa pengujian validasi ini dilakukan secara rpitabilitas, maka persyaratan CV pengujian dinyatakan baik jika lebih kecil dari 0,66 x CV Horwitz^(2,9). Adapun nilai 0,66 x CV Horwitz dari metode ini adalah 7,47%, sehingga dengan CV pengujian (2,07%) memenuhi persyaratan karena lebih kecil dari 0,66 x CV Horwitz metode uji.

2. Uji Presisi

Presisi menurut Kemenkes (2014) adalah tingkat kedekatan diantara hasil uji individu jika prosedur diterapkan berulang kali terhadap sampling ganda atau sampel yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Uji presisi dapat dilaksanakan dengan rpitabilitas, reproduibilitas, ataupun dengan presisi antara⁽²⁾. Rpitabilitas adalah presisi metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Adapun presisi antara apabila pengujian dilakukan oleh analis yang berbeda dalam waktu yang berbeda akan tetapi dilakukan dalam laboratorium yang sama. Reproduibilitas adalah presisi metode jika dikerjakan pada kondisi beberapa laboratorium yang berbeda^(2,7).

Tabel 2 Hasil uji akurasi dengan tiga konsentrasi *working standard* diklazuril

Pengulangan	Kadar <i>working standard</i> diklazuril dalam plasebo	Konsentrasi akhir diklazuril yang diukur	Hasil kadar teruji dalam bentuk %
1	0,75%	15 ppm	98,60
2	0,75%	15 ppm	98,06
3	0,75%	15 ppm	95,62
1	0,50%	10 ppm	102,02
2	0,50%	10 ppm	95,46
3	0,50%	10 ppm	98,42
1	0,25%	5 ppm	96,01
2	0,25%	5 ppm	97,77
3	0,25%	5 ppm	97,26
	Rata-rata (%)		97,69
	SD		2,02
	CV (%)		2,07

Tabel 3 Hasil uji presisi diklazuril 0,5%

Pengulangan	Hasil (%)
1	104,78
2	102,44
3	98,46
4	101,58
5	95,09
6	100,78
7	100,84
Rata-rata	100,57
SD	3,08
CV (%)	3,06

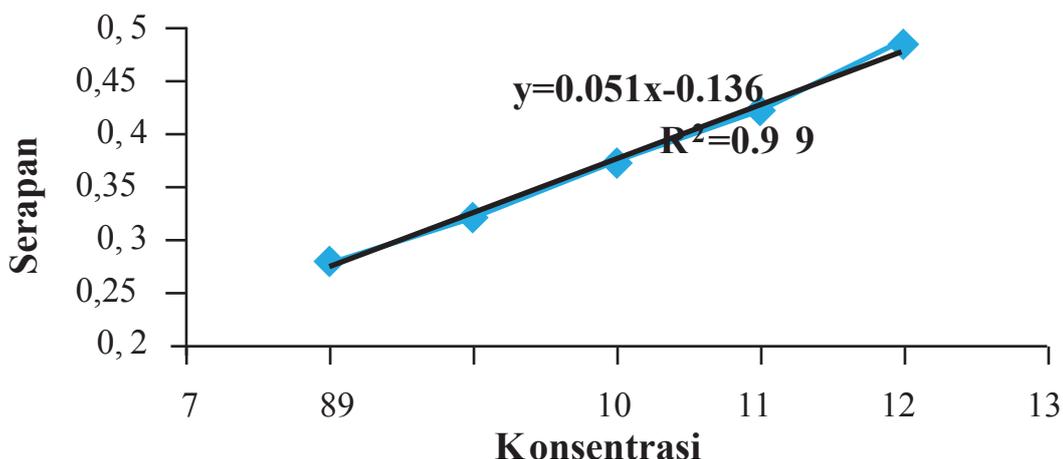
3. Uji Linearitas

Linearitas adalah kemampuan untuk menunjukkan secara langsung atau dengan melalui transformasi matematik yang tepat, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dalam rentang yang diberikan⁽¹⁰⁾. Menurut ICH (2005) penetapan linearitas dapat dilakukan dengan menggunakan 5 titik konsentrasi standar. Adapun konsentrasi yang digunakan untuk uji linearitas dalam rangka validasi metode pengujian kadar zat aktif dalam

suatu sediaan adalah 80-120% dari zat aktif saat pengujian yang dilakukan^(2, 8). Dalam metode uji ini menggunakan 10 ppm dalam pengujiannya, sehingga untuk uji linearitas digunakan 5 titik konsentrasi yaitu: 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, dan 12 ppm. Berdasarkan hasil uji untuk linearitas didapatkan nilai r adalah 0,99 (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa metode ini memiliki linearitas yang baik karena memenuhi persyaratan bahwa nilai $r \geq 0,99$ ⁽²⁾. Hasil serapan untuk uji linearitas terdapat dalam Tabel 4.

Tabel 4. Konsentrasi dan serapan standar diklazuril

Konsentrasi Diklazuril (ppm)	Serapan
8	0,2792
9	0,321
10	0,3732
11	0,4215
12	0,4852
<i>Intercept</i>	(-)0,136
<i>Slope</i>	0,051
<i>R</i>	0,99



Gambar 2 Linearitas validasi uji kadar diklazuril

4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi merupakan konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi, tetapi tidak perlu kuantitatif dalam kondisi percobaan yang ditentukan⁽¹⁰⁾. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Uji batas semata-mata menunjang bahwa konsentrasi analit dibawah atau diatas aras tertentu. Menurut Harmita (2004) batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Adapun batas kuantitasi adalah karakteristik penetapan kuantitatif pada aras rendah dari senyawa dalam matrik sampel atau kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi yang dapat diterima^(7, 10).

Guna mendapatkan batas deteksi dan batas kuantitasi dari metode uji yang divalidasi maka

dilakukan pengujian dengan menggunakan sampel obat hewan yang mengandung diklazuril 5 mg/g dengan pengulangan enam kali. Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung dengan menggunakan rumus no. 8 dan rumus no. 9. Adapun untuk nilai *slope* diambil dari nilai *slope* yang dihasilkan dari uji linearitas. Hasil uji batas deteksi dan batas kuantitasi tersaji dalam Tabel 5.

Berdasarkan hasil uji batas deteksi maka didapatkan batas deteksi untuk metode ini adalah menguji analit diklazuril 0,480 ppm. Meskipun metode mampu menguji diklazuril dalam konsentrasi akhir 0,480 ppm akan tetapi hasil tersebut masih bisa memberikan bias. Adapun untuk batas kuantitasi didapatkan 1,601 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi terendah dari diklazuril pada konsentrasi akhir yang diuji dengan presisi dan akurasi yang baik adalah 1,601 ppm.

Tabel 5 Hasil uji batas deteksi dan batas kuantitasi

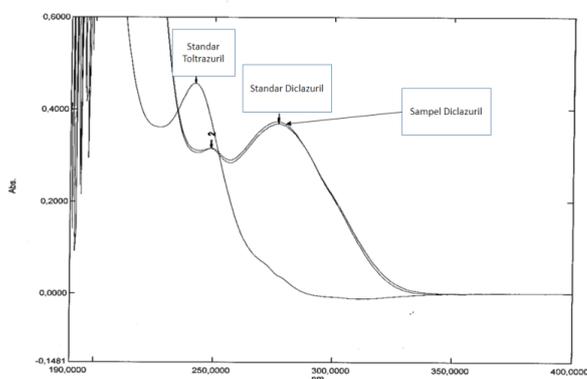
No Sampel	Konsentrasi diklazuril terhitung saat diuji (ppm)	Absorbansi (y)	y ₁	(y-y ₁) ²
1	10,54	0,3934	0,4016	0,000067
2	10,31	0,3846	0,3896	0,000025
3	9,91	0,3772	0,3692	0,000065
4	9,30	0,3472	0,3385	0,000076
5	9,57	0,357	0,3519	0,000026
6	10,14	0,3784	0,3811	0,000007
Jumlah(y-y ₁) ²				0,000267
Jumlah(y-y ₁) ² /(n-2)				0,000067
Simpangan baku residual [akar dari Jumlah/(n-2)] (SDr)				0,008
LOD = 3SDr/b				0,480
LOQ = 10SDr/b				1,601

Uji Spesifisitas

Guna mengetahui spesifisitas dari pengujian ini dilakukan juga pengujian kadar pengecoh yaitu toltrazuril dengan menggunakan metoda uji yang sama dengan diklazuril. Berdasarkan hasil kromatogram didapatkan bentuk kromatogram toltrazuril berbeda dengan standar ataupun sampel diklazuril. Adapun panjang gelombang maksimum dari toltrazuril juga berbeda dengan standar maupun diklazuril. Panjang gelombang maksimum standar dan sampel diklazuril adalah 277 nm adapun standar toltrazuril adalah 244 nm sebagaimana terdapat dalam Gambar 3. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini dapat membedakan kandungan diklazuril dengan zat lainnya apabila bentuk sediaan obat hewan hanya memiliki satu jenis zat aktif saja.

Berdasarkan parameter-parameter validasi yang dilakukan, maka metode uji kadar diklazuril dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol dapat memberikan hasil

yang valid. Selain itu metode ini memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan metode uji diklazuril dengan menggunakan KCKT sebagaimana dalam FOHI Jilid 2 Edisi IV⁽³⁾. Metode ini lebih mudah dan lebih cepat pengerjaannya dibandingkan dengan metode uji yang menggunakan KCKT. Dari sisi penggunaan bahan, metode ini juga hanya menggunakan dua bahan yaitu sodium asetat trihidrat dan metanol p.a. Berbeda dengan pengujian KCKT yang memerlukan lebih dari dua bahan yang digunakan sebagai pelarut dan fase gerak^(3,11). Terlebih dari segi biaya instrumen spektrofotometer UV-Vis relatif lebih murah jika dibandingkan dengan KCKT. Oleh karena itu, biaya operasional pengujian yang dibutuhkan cukup terjangkau, sehingga dapat diterapkan oleh laboratorium yang memiliki keterbatasan dana operasional. Dengan demikian, metode ini dapat digunakan dalam pengujian rutin uji kadar diklazuril tunggal dalam sediaan obat hewan serbuk.



Gambar 3 Kromatogram standar diklazuril, sampel diklazuril, dan standar toltrazuri

KESIMPULAN

Metode uji kadar diklazuril dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol memiliki presisi, akurasi, linearitas, dan spesifisitas yang baik. Selain itu metode ini memiliki batas deteksi 0,480 ppm dan batas kuantitasi 1,610 ppm. Metode ini telah divalidasi dan dapat memberikan hasil yang valid untuk uji kadar diklazuril serbuk tunggal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Amer M, Amer AM, El-Ghany WAA. 2007. The efficacy of diclazuril (liquid formulation) in the prevention and control of coccidiosis in broiler chickens (semifield and field trials). Terdapat pada https://www.researchgate.net/publication/264348211_The_efficacy_of_diklazuril_liquid_formulation_in_the_prevention_and_control_of_coccidiosis_in_broiler_chickens (diunduh pada tanggal 05 Mei 2020)
2. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia [BPOM]. 2009. Petunjuk Operasional Penerapan Cara Pembuatan Obat yang Baik 2006. ID: Jakarta. Halaman 505-506, 583-592
3. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan [DJKPH]. 2009. Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid II Edisi 4. ID: Jakarta. Halaman 92-94
4. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan [DJKPH]. 2016. Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi X. ID: Jakarta. Halaman 183-203
5. *Europe Medicine Agency* [EMA]. 1996. Committee for Veterinary Medicinal Products: Diclazuril Summary Report (1). Terdapat dalam https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/diklazuril-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (diunduh pada tanggal 06 Mei 2020).
6. Hadi A. 2017. Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi ISO/IEC 17025:2017. ID: Jakarta. Halaman 183-195
7. Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* Vol. I (3): 117 - 135
8. International Council of Harmonization [ICH]. 2005. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Terdapat dalam https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf (diunduh pada tanggal 10 Juli 2019)
8. Kantasubrata JJ. 2011. Pelatihan Validasi dan Verifikasi Metode Pengujian, disampaikan dalam pelatihan In House Training Pelatihan Validasi dan Verifikasi Metode Pengujian, kerjasama BBPMSOH dan BSN, 24-25 Oktober 2011.
9. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia [Kemenkes]. 2016. Farmakope Indonesia Edisi V. ID: Jakarta. Halaman 1669-1673
10. Molteni R. 2010. Evaluation on the analytical method – Diclazuril. JRC.DG.D6/CvH/RMO/ag/ARES(2010)916639. EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE, Institute for Reference Materials and Measurements, Community Reference Laboratory for Feed Additives
11. World Health Organization [WHO]. 2001. Diclazuril: WHO Food Additives Series 36. Terdapat dalam <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je07.htm> (diunduh pada tanggal 06 Mei 2020)
12. Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P. 2005. Handbook of Analytical Chemistry: Water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates. ID: New Jersey John Wiley & Sons. Hal 532

VALIDASI METODE UJI KADAR ALBENDAZOLE SUSPENSI MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis

Ambarwati, Rosana Anita Sari, Siti Khomariyah, Nafisah Idrishanty., Maria Fatima Palupi.,
Emi Rusmiati, Luckyana Cerry

Unit Uji Farmasetik dan Premiks
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340
Email: ambarlestari@yahoo.com

ABSTRAK

Validasi metode uji kadar albendazol sediaan suspensi telah dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis di Unit Uji Farmasetik dan Premiks, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH). Validasi pengembangan metode uji kadar suspensi albendazol ini dilakukan dengan berpedoman pada ISO/IEC: 17025: 2017 guna menjamin mutu pelayanan dan meningkatkan kinerja BBPMSOH sebagai laboratorium pengujian terakreditasi. Sampel yang digunakan yaitu albendazol sediaan suspensi dengan pelarut H₂SO₄ 1% dalam methanol p.a. dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 307 nm. Parameter validasi yang digunakan yaitu presisi dengan pengujian sampel albendazol sebanyak 6 kali, akurasi dengan pengujian *working* standar sebanyak 3 konsentrasi dengan pengulangan 3 kali terhadap standar albendazol, linearitas dengan membuat kurva standar albendazol pada 5 konsentrasi, batas deteksi (*Limit of Detection/LOD*) dan batas kuantitasi (*Limit of Quantification/LOQ*). Validasi metode uji albendazol sediaan suspensi memberikan hasil presisi yang baik (CV uji 2,27% < CV Horwitz 11,31%), akurasi yang baik pada konsentrasi 10 ppm (*recovery* 96,76% dari batas 90-107%), linearitas yang baik ($r=0,99887$ dari $r>0,99$), dengan batas deteksi pada konsentrasi 1,30 mg/L (ppm) dan batas kuantitasi sebesar 4,34 mg/L (ppm).

Kata kunci : Albendazol, Metode, Validasi, Spektrofotometer UV-Vis

ABSTRACT

The method validation for albendazole suspension content test has been carried out using a UV-Vis spectrophotometer in pharmaceutical and premix assay laboratory, the national veterinary drug assay laboratory (NVDAL). Validation of method development for albendazole suspension content test was carried out in accordance with ISO/IEC: 17025: 2017 to ensure the quality of service and improve the performance of NVDAL as an accredited testing laboratory. The sample used was albendazol suspension with a solvent of 1% H₂SO₄ in methanol p.a. and measured using a UV-Vis spectrophotometer at a maximum wavelength of 307 nm. The validation parameters used were precision by testing the albendazole sample 6 times, accuracy with 3 different working standard concentrations with 3 repetitions of the albendazole standard, linearity by making a standard curve of albendazole at 5 concentrations, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The validation of the albendazole test method for suspension preparations produced good precision results (CV test 2.27% < CV Horwitz 11.31%), good accuracy at a concentration of 10 ppm (96.76% recovery from the 90-107% limit), good linearity. ($r = 0.99887$ from $r > 0.99$), with a limit of detection at a concentration of 1.30 mg / L (ppm) and a limit of quantitation of 4.34 mg / L (ppm).

Key words: Albendazole, Method, Validation, Spectrophotometer UV-Vis

PENDAHULUAN

Infeksi cacing nematoda pada saluran pencernaan hewan merupakan salah satu faktor penghambat upaya meningkatkan produktivitas ternak, antara lain penurunan berat badan maupun kematian ternak. Penanggulangan yang dilakukan yaitu dengan memberikan obat cacing (anthelmintik) dan yang sering digunakan pada ruminansia menurut informasi dari beberapa Dinas Peternakan dan perusahaan obat hewan di Indonesia yaitu dari golongan benzimidazole⁽¹²⁾.

Albendazol merupakan obat hewan golongan anthelmintik derivat benzimidazol berspektrum luas yang cukup dikenal luas di dunia kedokteran hewan. Daya ovicidal dari albendazol yang kuat terhadap *Ascaris suum* dan *Fasciola hepatica* dengan cara merusak struktur telur (deformasi). Efek ovicidal dari methylcarbamate benzimidazole pada nematode yaitu di afinitas B-tubulin, mampu menembus kulit telur dan menumpuk di dalam telur. Albendazol beserta metabolitnya bekerja dengan menghambat sintesis mikrotubulus, sehingga mengurangi pengambilan glukosa secara irreversibel dan cacing akan lumpuh⁽⁸⁾.

Albendazol mempunyai karakteristik berupa serbuk putih kekuningan, tidak larut dalam air dan alkohol, sangat sukar larut dalam metilen klorida dan mudah larut dalam asam format anhidrat⁽¹⁾. Bentuk sediaan albendazol dalam obat hewan antara lain suspensi, bolus, kaplet, tablet, pasta maupun serbuk. Nama dagang dengan zat aktif albendazol di Indonesia, jumlahnya mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Jumlah albendazol yang terdaftar resmi di Indonesia menurut Indeks Obat Hewan Indonesia/IOHI (2014) sebanyak 46 produk dengan bentuk sediaan suspensi sebanyak 23 produk dan menurut IOHI (2016) sebanyak 49 produk dengan bentuk sediaan suspensi sebanyak 24 produk^(6,7).

Salah satu tugas dan fungsi Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) dalam SK Menteri Pertanian

No. 53/Permentan/ OT.140/5/2013 adalah pelaksanaan pengembangan teknik dan metode pengujian mutu obat hewan. Guna menjamin mutu pelayanan dan meningkatkan kinerja BBPMSOH maka selaku laboratorium pengujian terakreditasi, BBPMSOH melakukan validasi terhadap metode yang dikembangkan yang berpedoman pada ISO/IEC: 17025: 2017. Menurut ISO/IEC: 17025: 2017, validasi merupakan konfirmasi melalui pengujian dan penyediaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud terpenuhi. Parameter validasi untuk unjuk kerja pengujian antara lain meliputi presisi (keseksamaan), akurasi (kecermatan), linearitas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)^(2, 5, 10).

Dalam melaksanakan pengujian mutu obat hewan di BBPMSOH menggunakan referensi Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid II Edisi 4 Tahun 2009. Pengujian obat hewan albendazol dalam FOHI Jilid II Edisi 4 Tahun 2009 dilakukan dengan metode titrimetri. Mengingat jumlah sampel yang semakin meningkat, maka penting untuk memberikan jaminan mutu hasil kepada pelanggan dengan hasil yang valid. Oleh sebab itu, perlu dikembangkan suatu metode uji yang mudah, sederhana dan aman, namun memberikan jaminan mutu hasil kepada pelanggan dengan hasil uji yang valid. Berdasarkan pertimbangan di atas, BBPMSOH, khususnya Unit Uji Farmasetik dan Premiks melakukan pengembangan metode uji kadar obat hewan albendazol sediaan suspensi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan melakukan validasi terhadap metode uji tersebut. Hal ini penting untuk memberikan bukti bahwa metode yang dikembangkan tersebut memiliki unjuk kerja yang baik dan hasilnya tidak berbeda nyata dengan metode uji yang sudah ada.

Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui bahwa metode uji kadar albendazol menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang dikembangkan, mampu secara konsisten memberikan hasil yang valid dan hal ini sejalan dengan salah satu tupoksi BBPMSOH yaitu

untuk mengembangkan metode pengujian obat hewan.

MATERI DAN METODE

Materi

Bahan yang digunakan antara lain: *working* standar albendazole (Sigma, USA), 1 kemasan arsip sampel albendazol suspensi yang mengandung albendazole 10% (100 mg/mL), H₂SO₄ p.a. (Merck, Jerman), methanol p.a. (Merck, Jerman), distilled water (DW).

Alat

Neraca digital (Shimadzu), botol timbang, sendok timbang, labu ukur 100 mL, tabung reaksi, gelas beker, pipet volumetrik 1-10 mL, kuvet, *magnetic stirrer*, dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1800).

Metode

Uji Umum

Uji umum sampel albendazol yang dilakukan adalah mengidentifikasi warna dari sampel. Uji ini mengandalkan pengamatan secara visual sehingga tidak dilakukan validasi.

Uji Kadar

Parameter yang dinilai adalah:

1. Presisi, dilakukan dengan melakukan pengujian arsip sampel minimal 6 kali dengan metode sebagai berikut:
Pipet sejumlah sampel setara 100 mg albendazol. Larutkan dan encerkan dengan larutan H₂SO₄ 1% dalam metanol p.a. ke dalam labu ukur 100 mL. Lakukan pengenceran bertingkat dengan larutan H₂SO₄ 1% dalam metanol p.a. hingga didapatkan konsentrasi akhir 10 ppm. Untuk standar, timbang dengan tepat 10 mg *working* standar, larutkan dalam 10 mL larutan H₂SO₄ 1% dalam metanol p.a.. Buat pengenceran bertingkat dengan larutan H₂SO₄ 1% dalam metanol p.a. hingga didapatkan konsentrasi akhir 10 ppm.

Hitung kadar yang didapatkan dari sampel dengan menggunakan rumus:

% Kadar albendazol dalam sampel =

$$\frac{A_{spl}}{A_{std}} \times \frac{C_{std}}{C_{spl}} \times 100\%$$

Keterangan : A_{spl} = serapan sampel
A_{std} = serapan standar
C_{std} = konsentrasi standar
C_{spl} = konsentrasi sampel

Nilai CV didapat dengan menghitung standar deviasi (SD), kemudian nilai Relatif Standar Deviasi (RSD) dengan rumus sebagai berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (\text{rumus 1})$$

$$RSD = \frac{SD}{x}$$

$$CV = RSD \times 100\% \quad (\text{rumus 2})$$

Nilai RSD didapatkan dengan rumus sebagai berikut:

$$RSD = \frac{SD}{x} \quad (\text{rumus 3})$$

Nilai CV hasil pengujian kemudian dibandingkan dengan nilai CV Horwitz. Nilai CV Horwitz didapatkan dengan rumus:
CV (Horwitz) = $2^{1-0.5 \log C}$ (rumus 4)

$$CV (\%) = 0,66 \times 2^{1-0.5 \log C} \quad (\text{rumus 5})$$

Keterangan:

A_{spl} = serapan sampel
A_{std} = serapan standar
C_{spl} = konsentrasi sampel
C_{std} = konsentrasi standar
RSD = Relatif Standar Deviasi
SD = Standar Deviasi
X = rata-rata
C = konsentrasi akhir analit saat diukur

Presisi dinyatakan baik jika dilakukan oleh personel yang sama dalam waktu yang sama CV pengujian < 0.66 x CV Hortwitz (rumus 5) dan bila dilakukan oleh lebih dari 1 orang personel maka CV pengujian < CV Horwitz ⁽¹⁰⁾.

2. Akurasi, dilakukan dengan mencari nilai perolehan kembali dari *working* standar. Ditimbang *working* standar albendazol sejumlah 10,2 mg; 15,3 mg dan 20 mg dan *master* standar albendazol 10 mg. Larutkan dalam 10 mL larutan H₂SO₄ 1% dalam metanol p.a., lakukan pengenceran bertingkat hingga didapatkan konsentrasi akhir master standar 10 ppm dan *working* standar secara berturut-turut 10,2 ppm; 15,3 ppm dan 20 ppm. Ukur kadar sebagaimana rumus dalam metode pengujian presisi. Pengujian dilakukan minimal 3 kali pada masing-masing konsentrasi dan akurasi dinyatakan baik apabila perolehan kembali dari *working* standar ada dikisaran 90-107% ^(2,6,8).
3. Linearitas, dilakukan dengan membuat kurva standar albendazol, sebanyak minimal 5 konsentrasi. Pada validasi metode ini dilakukan pengujian dengan membuat kurva standar dengan 5 konsentrasi yaitu: 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm dan 12 ppm. Ukur serapan pada panjang gelombang maksimal (307 nm). Hitung linieritas (r), linieritas dinyatakan baik apabila nilai r > 0,99% ^(2,3,6).

4. Limit deteksi (LOD) metode, dihitung dengan rumus:

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \text{ (rumus 6)}$$

Data pengujian dapat diambil dari pengujian presisi dan linearitas.

5. Limit kuantitas metode (LOQ), dihitung dengan rumus:

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \text{ (rumus 7)}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\sum \frac{(Y-y_i)^2}{n-2}} \text{ (rumus 8)}$$

Data pengujian dapat diambil dari pengujian presisi dan uji linearitas.

Keterangan:

- S_{y/x} = standar deviasi respon analitik dari blangko
 b = slope / kemiringan dari garis pada persamaan garis
 Y = absorbansi pengukuran
 y_i = nilai perhitungan kadar dalam rumus persamaan regresi (y_i = bx + c) dari linearitas
 n = jumlah pengulangan pengujian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode pengujian albendazol dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis merujuk pada pengujian senyawa sejenis ^(3,4). Larutan sampel dan standar albendazole dilarutkan dengan H₂SO₄ 1% dalam methanol p.a. diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum albendazol dalam larutan natrium hidroksida 0,1 M, menurut BP (2013), berada pada 308 nm dan panjang gelombang minimumnya pada 281 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum albendazol dalam larutan asam klorida 0,1 M, berada pada 292 nm dan panjang gelombang minimumnya pada 273 nm. Menurut FOHI (2009) panjang gelombang maksimum albendazol dalam larutan methanol yaitu di 296 nm dan panjang gelombang minimumnya di 277 nm.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan melakukan pembacaan zat aktif albendazol pada spektrofotometer UV-Vis dengan mode spektrum. Pola spektrum/pola kromatogram spesifik albendazol pada larutan H₂SO₄ 1% dalam methanol p.a. dapat terlihat dari pembacaan dengan mode ini. Hal

ini juga dapat digunakan sebagai pengujian identitas dari zat aktif albendazol. Pengukuran kadar albendazol pada larutan H₂SO₄ 1% dalam methanol p.a. dilakukan berdasarkan pada panjang gelombang maksimumnya yang terlihat dalam pola spektrumnya yaitu di 307 nm, sehingga pada validasi ini dikerjakan pada panjang gelombang maksimum tersebut.

Validasi Uji Kadar Albendazole

Presisi Uji Kadar

Penetapan kadar albendazol dilakukan dengan melakukan pengujian kadar terhadap 1 sampel albendazol suspensi sebanyak 10 kali dan dilakukan oleh 2 personel. Hasil uji terdapat dalam Tabel 1. Dari hasil tersebut, didapatkan nilai CV dari pengujian ini adalah 2,27% sedangkan CV Horwitz yang dihitung adalah

11,31%. Dari hasil tersebut terlihat bahwa CV hasil pengujian dengan metode ini lebih kecil dari CV Horwitz. Oleh sebab itu presisi metode uji ini memberikan presisi yang baik.

Akurasi Uji Kadar

Kecermatan (akurasi) merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dihitung dengan melakukan penetapan kadar standar untuk menemukan perolehan kembali terhadap nilai standar sebenarnya. Validasi dilakukan dengan menguji standar albendazol dengan 3 konsentrasi yang berbeda (10,2 ppm; 15,3 ppm; 20 ppm) dan diulang masing-masing 3 kali untuk mencari rata-rata perolehan kembali. Hasil uji terdapat dalam Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Uji Kadar Sampel Albendazole suspensi

Pengujian ke:	Serapan	Sampel	Kadar (%)
1	0.373		98,44%
2	0.377		99,36%
3	0.385		101,52%
4	0.377		99,26%
5	0.390		102,77%
6	0.378		99,71%
7	0.376		99,17%
8	0.394		103,80%
9	0.395		104,07%
10	0.395		104,14%
X (kadar)			101,22%
SD (kadar)			0,023
CV kadar (%)			2,265

Tabel 2. Hasil Perolehan Kembali Standar Albendazole

Konsentrasi (ppm)	Serapan (Absorbansi)	Hasil diperoleh (%)
10,2	0.373	94,44%
10,2	0.378	99,36%
10,2	0.377	99,26%
15,3	0.561	96,14%
15,3	0.556	95,33%
15,3	0.586	100,41%
20	0.755	95,19%
20	0.755	95,91%
20	0.745	94,76%
Rata-rata perolehan kembali		96,76%
SD		0,023
CV		2,349

Nilai perolehan kembali (*recovery*) yang didapat dari metode ini adalah 96,76%. Nilai perolehan kembali yang diperoleh metode ini kemudian dibandingkan dengan nilai perolehan kembali untuk analit 10 ppm yaitu 90 – 107%⁽⁸⁾. Hasil nilai perolehan kembali metode ini berada dalam batas nilai perolehan kembali untuk analit 10 ppm (90 – 107%) maka metode uji albendazol menggunakan spektrofotometri mempunyai akurasi yang baik.

Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan^(2,3). Linearitas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (*y*) dengan konsentrasi (*x*). Data yang diperoleh selanjutnya diolah untuk dapat menentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep dan koefisien korelasinya (*r*).

Pengujian dilakukan pada 5 konsentrasi yaitu 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm dan 12 ppm. Pengujian lineritas menghasilkan kurva kalibrasi standar dengan persamaan regresi $y = 0,0376862x + 0,00513916$. Nilai ini menghasilkan koefisien korelasi (r^2) sebesar

0,99887. Nilai *r* yang diperoleh mendekati 1,00 sedangkan syarat suatu metode uji mempunyai linearitas yang baik jika nilai *r* lebih besar dari 0,99^(3,6). Hal ini membuktikan bahwa metode uji albendazol dengan spektrofotometri mempunyai linearitas yang baik. Tabel hasil serapan untuk uji linearitas kurva standar didapatkan dalam Tabel 3.

Batas Deteksi (*Limit of Detection/ LOD*) dan Batas Kuantitasi (*Limit Of Quantification/ LOQ*)

Batas deteksi adalah karakteristik uji batas atau konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi. Batas deteksi umumnya dinyatakan sebagai konsentrasi analit dalam sampel⁽³⁾. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis yang diartikan sebagai jumlah/ konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama⁽⁸⁾. Data perhitungan LOD dan LOQ metode uji terdapat dalam Tabel 4.

Dari hasil perhitungan, diperoleh batas deteksi untuk pengujian albendazol dengan metode spektrofotometri yaitu pada konsentrasi 1,30 mg/L (ppm). Nilai batas kuantitasi yang diperoleh pada pengujian ini sebesar 4,34 mg/L (ppm).

Tabel 3. Hasil Serapan Linearitas

Konsentrasi	Serapan
8 ppm	0.295
9 ppm	0.334
10 ppm	0.375
11 ppm	0.410
12 ppm	0.445

Tabel 4. Data Perhitungan LOD dan LOQ Uji Kadar Albendazol Suspensi

Pengujian ke:	Konsentrasi	Abs (Y)	y1	(y-y1)	(y-y1) ²
1	10	0.373	0.372	0,001	0,000001
2	10	0.377	0.372	0,005	0,000025
3	10	0.385	0.372	0,013	0,000169
4	10	0.377	0.372	0,005	0,000025
5	10	0.390	0.372	0,018	0,000324
6	10	0.378	0.372	0,006	0,000036
7	10	0.376	0.372	0,004	0,000016
8	10	0.394	0.372	0,022	0,000484
9	10	0.395	0.372	0,023	0,000529
10	10	0.395	0.372	0,023	0,000529
Jumlah					0,002137
Jumlah/(n-2)					0,000267
Simpangan baku residual [akar dari Jumlah/(n-2)] (Sy/x)					0,016344
LOD					1,30
LOQ					4,34

KESIMPULAN

Validasi metode uji kadar obat hewan albendazol sediaan suspensi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pelarut H₂SO₄ 1% dalam metanol p.a., didapatkan bahwa nilai presisi, akurasi, dan linearitas yang baik, sedangkan nilai LOD dan LOQ metode uji adalah masing-masing 1,30 ppm dan 4,34 ppm. Pengujian kadar albendazol sediaan suspensi menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan pelarut H₂SO₄ 1% dalam metanol p.a. dapat digunakan dalam pengujian rutinitas dan memberikan hasil yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. 2009. Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid II Edisi IV. Jakarta (ID): Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Halaman 31-33.
2. Anonim. 2013. British Pharmacopoeia. Part SC.III F. *Validation of Analytical Procedures*. Halaman 91.
3. Anonim. 2013. British Pharmacopoeia. Volume I & II. Albendazole. Halaman 33.
4. Anonim. 2013. British Pharmacopoeia. Specific Monograph Veterinary. Albendazole Oral Suspension. Halaman 3-4.
5. Anonim. 2010. Suplemen II Farmakope Indonesia Edisi IV. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Halaman 1852-1857.
6. Anonim. 2014. Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi IX. Kementerian Pertanian. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Halaman 199-236.
7. Anonim. 2016. Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi X. Kementerian Pertanian. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Halaman 207-246.
8. Astuti KRK, Ardana IBK, Anthara MS. 2017. Indonesia Medicus Veterinus. Efek Ovicidal Albendazole 10% terhadap Telur Cacing *Fasciola gigantica* secara In Vitro. Diunduh online pada <http://ojs.unud.ac.id/php.index/imv>
9. BPOM, 2009. Petunjuk Operasional Penerapan Cara Pembuatan Obat yang Baik 2006, Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, Halaman 583-592.
10. Anwar H. 2018. Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
11. Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3):117-135.
12. Haryuningtyas D. dan Beriajaya. 2002. Wartazoa. Metode Deteksi Resistensi Terhadap Antelmintik Pada Domba dan Kambing. Diunduh online pada <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:EnLKzgYqp-wJ:medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa/article/download/769/778+&cd=6&hl=en&ct=clnk&gl=id>
13. ISO/IEC: 17025: 2017. *General Requirements for The Competence of The Testing and Calibration Laboratories*, ISO. Geneva. Switzerland.
14. Kantasubrata J. 2011. Modul Pelatihan dalam In House Training : Validasi dan Validasi Pengujian di BBPMSOH, 24-25 Oktober 2011 Bekerjasama dengan BSN.

TINJAUAN ILMIAH ANTIBIOTIK DAN MEKANISME RESISTANSI ANTIMIKROBA PADA BAKTERI

Muhammad Zahid¹⁾ dan Isnindar²⁾

¹⁾Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340

²⁾Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak-Kalimantan Barat, 78124

Email:zahid.achmad@gmail.com¹

ABSTRAK

Di era belum ditemukannya antibiotik, infeksi ringan mungkin dapat menyebabkan kematian. Sejak diperkenalkannya antibiotik pertama yaitu *arsphenamine* (salvarsan) pada tahun 1909 oleh Paul Ehrlich dan Sahachirō Hata, diikuti dengan penemuan beberapa antibiotik lainnya, infeksi berat sekalipun dapat diobati. Akan tetapi, saat ini adanya tren peningkatan resistansi Antimikroba di hampir semua bakteri patogen menyebabkan infeksi bakteri mungkin tidak dapat diobati, dan kita kembali seperti saat pra-antibiotik. Pada tinjauan ilmiah ini akan dibahas jenis dan mekanisme kerja Antimikroba, untuk selanjutnya disebut antibiotik, terhadap bakteri dan mengapa antibiotik sangat penting dalam pengobatan. Lebih jauh lagi tulisan ini menjelaskan mekanisme resistansi antibiotik, bagaimana bakteri menjadi kebal terhadap antibiotik, mekanisme mutasi kromosomal dan rekombinasi, serta elemen-elemen genetik seperti plasmid dan transposon yang berperan penting menyebabkan bakteri menjadi resistan terhadap antibiotik.

Kata kunci: Antimikroba, antibiotik, resistansi, mutasi

ABSTRACT

In an era where antibiotics were not yet invented, a minor infection may lead to death. Since Paul Ehrlich dan Sahachirō Hata's introduction of the first antibiotic, arsphenamine (salvarsan) in 1909, followed by the discovery of several other antibiotics, even severe infections can be treated. However, there is currently an increasing trend of antimicrobial resistance in almost all bacterial pathogens making bacterial infections possibly untreatable, returning to where antibiotics were not yet discovered. This scientific review will discuss the types and action mechanisms of antimicrobials, especially antibiotics, against bacteria and why antibiotics are extremely important in medicine. Furthermore, this paper explains the mechanism of antimicrobial resistance, how bacteria become resistant to antimicrobials, the mechanism of chromosomal mutation and recombination, and genetic elements such as plasmids and transposons which play an important role in causing bacteria to become resistant to antibiotics.

Key words: antimicrobial, antibiotic, resistance, mutation

Latar Belakang

Infeksi bakteri selalu menjadi masalah utama yang menyebabkan masalah kesehatan pada manusia. Antara lain, infeksi oleh bakteri patogen seperti tuberkulosis (TBC) yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, gonore yang disebabkan oleh *Neisseria gonorrhoeae*, dan batuk rejan yang disebabkan oleh *Bordetella pertussis*. Pada era pra-antibiotik, luka kecil yang terinfeksi oleh bakteri seperti *Staphylococcus aureus* dapat dengan mudah berubah menjadi infeksi aliran darah (sepsis) yang mengancam jiwa. Hanya sebagian kecil pasien yang didiagnosis dengan sepsis (<20%) akan bertahan. Sejak antibiotik diperkenalkan, infeksi bakteri menjadi mudah diobati⁽¹⁷⁾. Namun, tren resistansi antibiotik saat ini di sebagian besar semua patogen bakteri telah meningkatkan untuk kembali ke situasi bahwa infeksi bakteri tidak dapat diobati⁽¹⁰⁾.

Adanya antibiotik, populasi bakteri resistan minor memiliki keuntungan pertumbuhan selektif dan berkembang biak, sementara bakteri yang tidak resistan mati. Penggunaan yang tidak tepat atau penyalahgunaan antibiotik dapat menyebabkan amplifikasi selektif populasi resistan dan dianggap sebagai salah satu alasan utama untuk munculnya patogen bakteri resistan obat. Menurut laporan dari *Center for Disease Control* (CDC) USA, sekitar 50% dari resep antibiotik dianggap tidak perlu⁽⁶⁾. Penggunaan antibiotik lebih tinggi di antara pasien rawat inap dengan sekitar 33% dari semua pasien di Eropa menerima setidaknya satu agen Antimikroba⁽¹³⁾. Hubungan erat antara penggunaan antibiotik dan tingkat resistansi diilustrasikan oleh pengurangan tingkat resistansi yang dicapai karena pengurangan antibiotik secara keseluruhan di Eropa⁽²¹⁾. Faktor lain yang menyebabkan penyebaran resistansi cepat adalah transmisi dari manusia ke manusia. Ini ditunjukkan oleh penyebaran cepat klon *Methicilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) di rumah sakit dan masyarakat di seluruh dunia⁽³⁾. Sebuah

studi sekuensing genom seluruh MRSA baru-baru ini dari berbagai daerah di Inggris mengidentifikasi beberapa kluster transmisi dari klon MRSA dominan dalam komunitas dan rumah sakit⁽⁸⁾.

Selain penggunaan antibiotik pada manusia, antibiotik juga digunakan pada hewan, terutama pada ternak. Diyakini bahwa penggunaan antibiotik pada ternak sebagai pemacu pertumbuhan dan untuk pencegahan infeksi mendorong seleksi populasi bakteri yang resistan pada hewan⁽¹⁸⁾. Ternak diduga sebagai *reservoir* potensial untuk bakteri yang resistan terhadap obat yang menginfeksi manusia, yang mungkin melibatkan transfer *strain* yang resistan terhadap obat atau gen resistansi melalui elemen genetik bergerak seperti plasmid. Penelitian genomik *One Health* menjelaskan bahwa transmisi bakteri yang resistan terhadap obat-obatan dapat terjadi antara hewan dan manusia. Namun, sebuah studi baru-baru ini menunjukkan bahwa *E. coli* yang menyebabkan infeksi aliran darah pada pasien di Inggris tidak diperoleh dari ternak dan tidak ditransmisikan oleh plasmid antara hewan dan manusia^(5, 22). Disamping itu, dalam beberapa kasus, ditemukan gen di lingkungan yang resistan terhadap logam berat yang dibawa oleh plasmid. Oleh karena itu, kontaminasi logam berat pada tanah atau penggunaannya dalam peternakan juga menyebabkan pemilihan sel bakteri yang resistan. Ini disebabkan logam berat juga digunakan dalam pertanian sebagai fungisida atau bakterisida dan dapat mengarah pada pengayaan selektif populasi resistan^(1, 9, 25).

Pengertian dan Jenis Antimikroba

Antimikroba adalah zat atau bahan yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme (misalnya: bakteri, jamur, parasit, dan virus). Pada makalah kali ini untuk selanjutnya yang dibahas adalah Antimikroba yang mampu membunuh bakteri khususnya antibiotik. Ada tiga jenis Antimikroba

yang bekerja melawan bakteri, yaitu:

1. Antiseptik (misalnya digunakan untuk membersihkan luka agar mencegah infeksi).
2. Desinfektan (misalnya digunakan untuk membersihkan sebuah permukaan dari mikroorganisme).
3. Antibiotik yaitu senyawa atau zat yang dapat membunuh atau mencegah pertumbuhan bakteri dan digunakan secara internal sebagai obat atau digunakan secara topikal (misalnya pada kulit atau mata).

Antibiotik

Selama ribuan tahun manusia telah menggunakan berbagai zat untuk mencegah atau mengobati infeksi termasuk tanaman, jamur roti, dan madu. Pada akhir abad ke-19, para ilmuwan menemukan bahwa sel-sel bakteri dapat diwarnai oleh pewarna kimia. Ini mendorong para ilmuwan untuk mulai mencari senyawa yang akan membunuh bakteri patogen.

Antibiotik pertama yang ditemukan adalah *arsphenamine* (salvarsan), yang ditemukan pada tahun 1909 oleh Paul Ehrlich dan Sahachirō Hata. Ini adalah pengobatan efektif pertama untuk infeksi menular seksual sifilis yang disebabkan oleh *Treponema pallidum*. Selanjutnya pada tahun 1932 dengan penemuan prontosil oleh tim yang dipimpin oleh Gerhard Domagk, yang secara sistematis menguji pewarna kimia untuk kemampuan mereka membunuh bakteri⁽¹⁸⁾. Prontosil adalah antibiotik sulfonamid, yang efektif melawan sejumlah bakteri patogen yang berbeda dan masih digunakan sampai sekarang. Baik *arsphenamine* dan prontosil merupakan antibiotik sintesis.

Pada tahun 1928 Alexander Fleming menemukan bahwa jamur yang disebut *Penicillium chrysogenum* menghasilkan senyawa yang dapat membunuh bakteri

patogen *S. aureus*. Ini merupakan antibiotik pertama yang berasal dari organisme hidup. Fleming menamakan senyawa itu "penisilin" dan menemukan bahwa pada konsentrasi yang sangat rendah penisilin dapat membunuh sejumlah bakteri patogen. Meskipun Fleming membuat penemuan awal penisilin, akan tetapi dia tidak dapat melanjutkan penelitiannya lebih jauh⁽¹⁰⁾.

Penelitian penisilin dimulai kembali pada tahun 1940, Howard Flory mengumpulkan tim peneliti termasuk Ernst Chain, Norman Heatley, Edward Abraham, dan lainnya guna meneliti penisilin di Universitas Oxford. Mereka menemukan metode untuk mengekstrak penisilin dalam konsentrasi yang cukup tinggi untuk menguji efektivitas penisilin terhadap infeksi sebenarnya. Penisilin menunjukkan aktivitas yang sangat baik terhadap infeksi bakteri pada tikus. Mereka kemudian melanjutkan untuk melakukan uji klinis pertama pada pasien manusia dan percobaan klinis ini berhasil. Selanjutnya, para peneliti dan perusahaan farmasi di Amerika Serikat mengembangkan metode untuk memungkinkan produksi skala industri dari penisilin untuk penggunaan klinis secara luas. Mengikuti kesuksesan penisilin, para peneliti mulai mencari jamur dan bakteri lain yang menghasilkan antibiotik. Pada tahun 1950-an hingga 1970-an berbagai jenis antibiotik baru ditemukan dan digunakan secara klinis, akan tetapi, pada tahun 1990-an penemuan antibiotik terhenti.

Mekanisme Kerja Antibiotik

Mekanisme kerja antibiotik secara garis besar adalah dengan cara membunuh bakteri yang dikenal dengan bakterisida atau dengan mencegah berkembangnya bakteri atau disebut bakteriostatik. Secara umum, antibiotik bekerja dengan merusak bagian-bagian penting dari struktur sel bakteri atau dengan mencegah fungsi seluler esensial terjadi. Target antibiotik secara luas, terdiri dari: (1) dinding dan membran sel bakteri, (2) sintesis *deoxyrybo nucleic acid* (DNA), dan (3) produksi protein.

1. Antibiotik yang bekerja pada dinding dan membran sel bakteri

Penisilin adalah antibiotik spektrum luas pertama yang ditemukan dan merupakan golongan antibiotik beta-laktam (β -laktam). Antibiotik β -laktam disebut demikian karena golongan ini memiliki struktur kimia yang sama yaitu cincin β -laktam. Keluarga β -laktam termasuk penisilin, sefalosporin dan karbapenem, merupakan beberapa antibiotik yang paling penting secara klinis ^(4, 10, 17).

Antibiotik β -laktam membunuh bakteri dengan mengikat enzim bakteri yang disebut penisilin pengikat protein (*Penicillin Binding Protein*, PBP). PBP ini berfungsi mengikat bagian-bagian lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri. Terikatnya PBP oleh antibiotik β -laktam akan menyebabkan terhentinya kerja PBP untuk membangun atau memperbaiki dinding sel bakteri yang mengakibatkan sel-sel bakteri pecah dan mati. Keluarga antibiotik glikopeptida yang mencakup vankomisin (antibiotik penting yang digunakan untuk mengobati infeksi yang resistan terhadap β -laktam) juga mencegah pembentukan dinding sel dengan menghambat sintesis peptidoglikan ^(30, 32).

Antibiotik golongan lipopeptida seperti daptomisin bekerja merusak membran sel dengan cara memasukkan dirinya ke dalam membran sel dan menginduksi depolarisasi membran. Antibiotik polimiksin misalnya kolistin, bekerja dengan cara berikatan dengan membran luar yang menyebabkan kerusakan pada membran sel ⁽²⁾.

2. Sintesis DNA

Ada beberapa antibiotik yang mencegah sintesis DNA, dengan menghambat transkripsi dan replikasi DNA melalui mekanisme yang berbeda. Antibiotik tersebut antara lain adalah kelompok sulfonamid, kuinolon, fluorokuinolon, aktinomisin D, linkomisin, metronidazol, dan rifampisin. Sebagai contohnya golongan

sulfonamid (antibiotik sintetik pertama), yaitu trimetoprim dan sulfametoksazol, dimana kedua antibiotik ini bekerja saling menguatkan (efek potensiasi) dengan menghambat aktivitas enzim yang terlibat dalam sintesis asam folat. Tanpa asam folat, bakteri tidak dapat mensintesis basis DNA (*adenine, thymine, cytosine, guanine*). Kelompok kuinolon dan fluorokuinolon (kuinolon yang mengandung atom fluor) bekerja dengan mengikat enzim yang dikenal sebagai topoisomerase. Enzim topoisomerase terlibat dalam penggumpalan DNA untuk membentuk bentuk heliks ganda. Terikatnya enzim topoisomerase oleh fluorokuinolon menyebabkan replikasi DNA terhenti, sehingga sel bakteri tidak dapat bereplikasi ^(31, 34, 35).

3. Produksi Protein

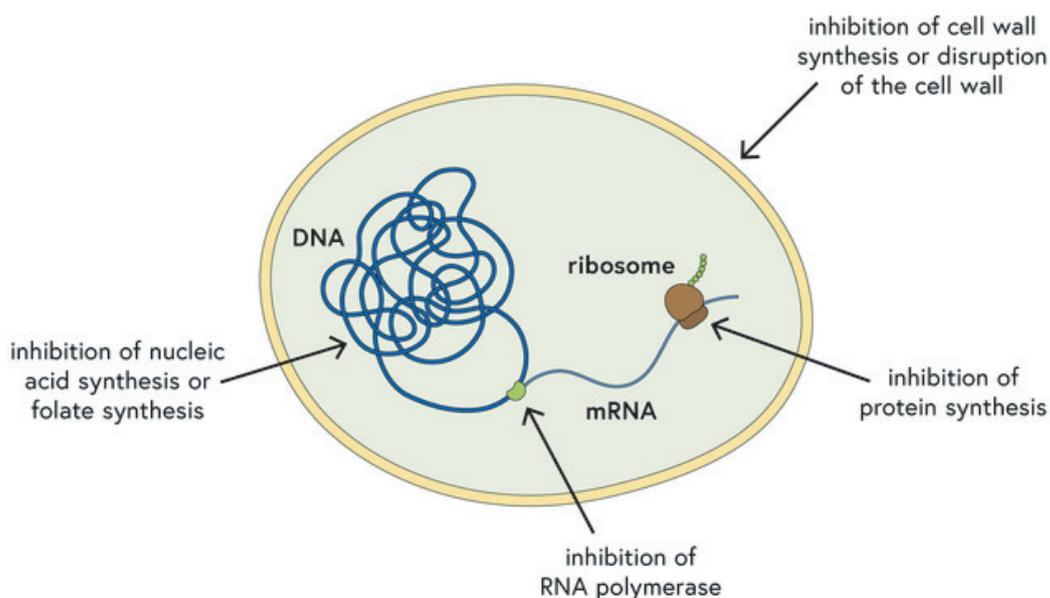
Rifampisin (antibiotik penting untuk pengobatan tuberkulosis) bekerja dengan mengikat RNA polimerase, enzim yang menyalin DNA ke dalam RNA. RNA kemudian digunakan sebagai *template* untuk mensintesis protein dalam ribosom. Dengan memblokir RNA polimerase, rifampisin menghentikan bakteri yang menghasilkan protein yang penting bagi kehidupan. Banyak keluarga antibiotik termasuk aminoglikosida, tetrasiklin, makrolida, fenikol, dan linkosamid bekerja dengan mengikat bagian ribosom bakteri yang menghalangi aktivitasnya. Ribosom adalah mesin yang membaca *template* RNA dan mensintesis protein (dikenal sebagai translasi) dengan menghubungkan asam amino yang berbeda. Antibiotik lain seperti mupirosin dan asam fusidik bekerja dengan mengganggu enzim bakteri lain yang bekerja dengan ribosom selama penerjemahan.

4. Mekanisme Resistansi Antibiotik

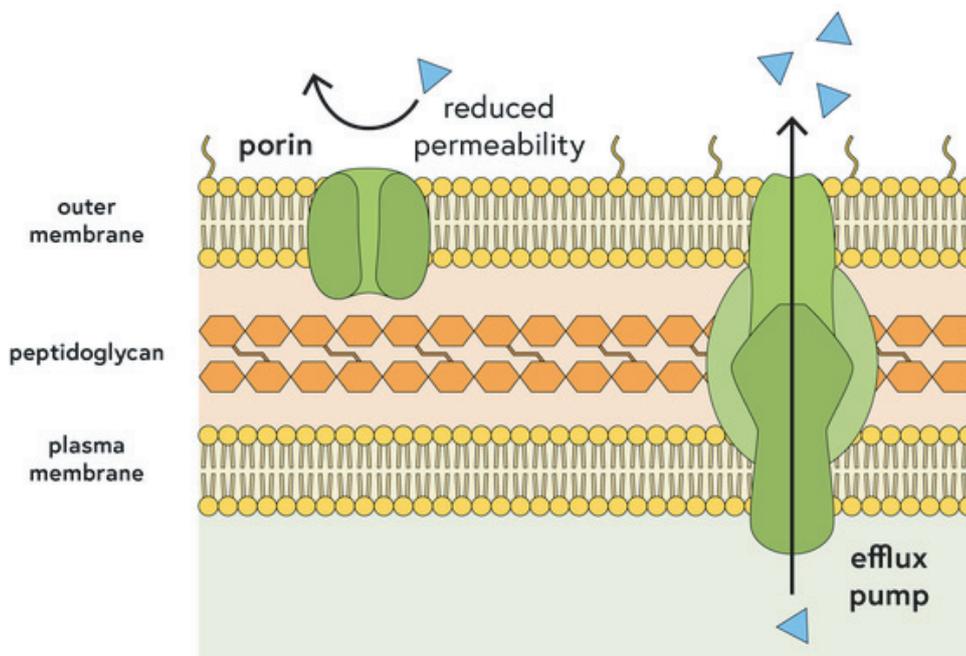
Ketika suatu bakteri secara alami resistan terhadap antibiotik atau keluarga antibiotik tertentu, tanpa perlu mutasi atau

mendapatkan gen lebih lanjut, mekanisme resistansi ini dikenal dengan resistansi intrinsik. Ini berarti bahwa antibiotik tersebut tidak dapat atau tidak tepat digunakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh spesies bakteri itu⁽¹³⁾. Contoh resistansi intrinsik adalah resistansi *Pseudomonas aeruginosa* (penyebab umum infeksi paru-paru pada penderita fibrosis kistik)

terhadap sebagian besar antibiotik β -laktam. Gambar 2. menunjukkan mekanisme resistansi intrinsik yang berbeda, termasuk penurunan permeabilitas membran luar, pengecualian selektif (*selective exclusion*) melalui porins dan pompa eflux (*efflux pumps*) yang secara aktif memompa antibiotik keluar dari sel.



Gambar 1 Mekanisme Kerja Antibiotik⁽²⁾



Gambar 2 Berbagai mekanisme resistansi intrinsik, termasuk penurunan permeabilitas membran luar, pengecualian selektif melalui porins dan pompa eflux⁽²⁾

Ada dua mekanisme utama dimana bakteri memediasi resistansi intrinsik, yaitu perbedaan permeabilitas dan akses membran dan memompa keluar (*pumping out*). Perbedaan permeabilitas dan akses membran berkenaan dengan struktur dinding bakteri, Bakteri diklasifikasikan menjadi dua kelompok yaitu gram-positif dan gram-negatif. Secara ringkas perbedaan struktural utama adalah bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal, sedangkan bakteri Gram-negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran luar ekstra yang mengandung lipopolisakarida. Perbedaan dalam struktur dinding sel ini berarti bakteri Gram-negatif resistan terhadap vankomisin (antibiotik glikopeptida) karena membran luarnya mencegah molekul besar seperti vankomisin memasuki sel. Bakteri Gram-negatif dan beberapa bakteri Gram-positif juga memiliki struktur yang disebut porins, yang bertindak sebagai pori dimana molekul termasuk nutrisi dapat melewati membran ke dalam sel. Pada beberapa bakteri yang secara intrinsik resistan, sifat kimia ataupun ukuran porinnya akan menentukan sifat resistan terhadap antibiotik tertentu. Jumlah porin yang dinyatakan (misal jumlah yang lebih sedikit) di dalam membran berkontribusi terhadap resistansi intrinsik.

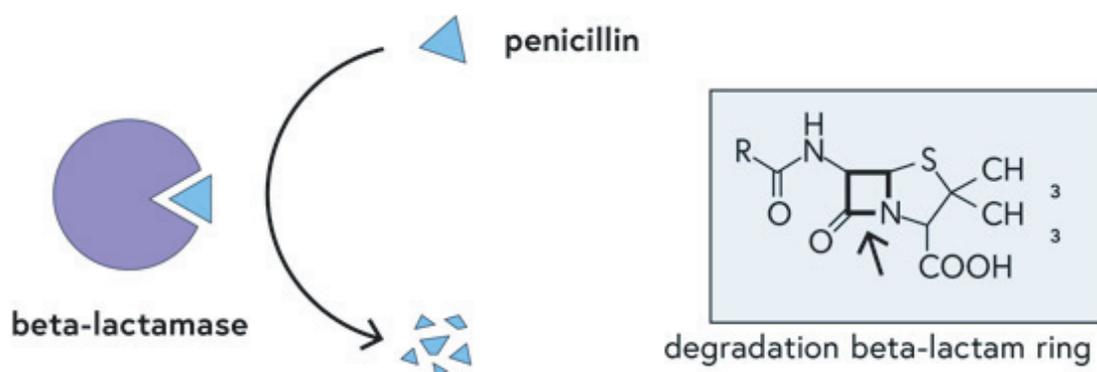
Mekanisme lain dari resistansi intrinsik pada bakteri Gram-negatif adalah karena adanya pompa efluks (*efflux pumps*). Pompa ini memompa antibiotik keluar dari sel sehingga mencegah mereka mencapai konsentrasi yang mematikan. Pompa efluks sering bekerja bersama dengan penurunan permeabilitas membran sel untuk memediasi resistansi intrinsik. Beberapa dari pompa efluks ini diklasifikasikan sebagai pompa efluks terhadap banyak obat (*multidrug-efflux pumps*) karena mereka memberikan resistansi terhadap sejumlah kelas antibiotik yang berbeda. Contoh hal adalah sistem efluks MexAB-OprM pada *P. aeruginosa* yang memediasi intrinsik dengan mengurangi kerentanan/sensitifitas terhadap

fluorokuinolon, tetrasiklin, phenikol, makrolida dan β -laktam⁽³¹⁾.

Selain mekanisme resistansi intrinsik, mekanisme resistansi pada bakteri ada juga yang bersifat *acquired*. Bakteri dapat bertukar atau memperoleh DNA menggunakan rekombinasi yang dimediasi oleh mekanisme yang meliputi transduksi (transfer DNA dari satu sel ke sel lainnya oleh bakteriofag), transformasi (penyerapan DNA eksogen dari lingkungan sekitarnya), konjugasi (transfer DNA dari satu bakteri ke bakteri lain melalui kontak sel ke sel), transposisi (transfer DNA oleh transposon, biasanya ditemukan terintegrasi dalam kromosom inang dan mengandung gen yang memungkinkan mereka untuk berintegrasi dan memotong (transposisi) dari kromosom)⁽¹²⁾. Dalam beberapa kasus, bakteri dapat memperoleh beberapa mekanisme resistansi terhadap antibiotik yang sama, dan pada bakteri yang resistan terhadap beberapa jenis obat, mereka memperoleh resistansi terhadap beberapa kelas antibiotik. Mekanisme resistansi dapat terjadi dalam beberapa proses sebagai berikut: (1) inaktivasi dan modifikasi antibiotik, (2) Modifikasi situs/tempat target antibiotik, (3) Produksi berlebih dari target, (4) Penggantian situs/tempat target, dan (5) Efluks dan mengurangi permeabilitas. Berikut penjelasan masing-masing mekanisme resistansi tersebut.

1. Inaktivasi dan modifikasi antibiotik

Inaktivasi oleh enzim adalah salah satu mekanisme resistansi yang ditemukan terhadap penisilin (antibiotik β -laktam). Strain dari *S. aureus* yang resistan terhadap penisilin ditemukan telah memperoleh enzim yang dikenal sebagai β -laktamase (awalnya dikenal sebagai penisilinase). Enzim β -laktamase menargetkan bagian dari antibiotik β -laktam yang dikenal sebagai cincin β -laktam, ini ditemukan pada semua antibiotik β -laktam. Enzim β -laktamase memecah cincin ini menjadi terbuka, mencegah antibiotik mengikat target bakteri^(16, 33), seperti yang terlihat pada Gambar 3.



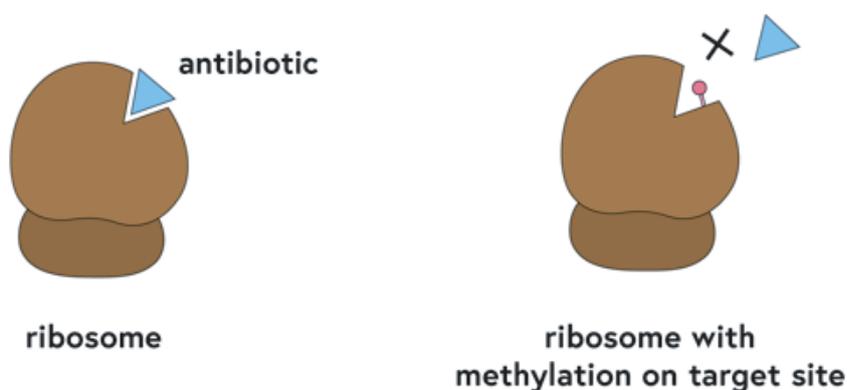
Gambar 3 Inaktivasi oleh enzim beta laktamase terhadap antibiotik golongan penisilin ⁽²⁾

β -laktamase adalah keluarga enzim (ada ribuan versi berbeda) yang ditemukan di banyak patogen bakteri. Mereka memiliki aktifitas yang berbeda, yang berarti beberapa akan bekerja melawan anggota spesifik dari keluarga β -laktam, sementara yang lain tidak. Anggota tertentu dari keluarga β -laktamase, yang dikenal sebagai karbapenemase, adalah yang paling ditakutkan karena enzim ini menginaktivasi semua anggota keluarga antibiotik β -laktam, termasuk karbapenem, yang menyebabkan pengobatan menjadi sangat terbatas ⁽⁵⁾.

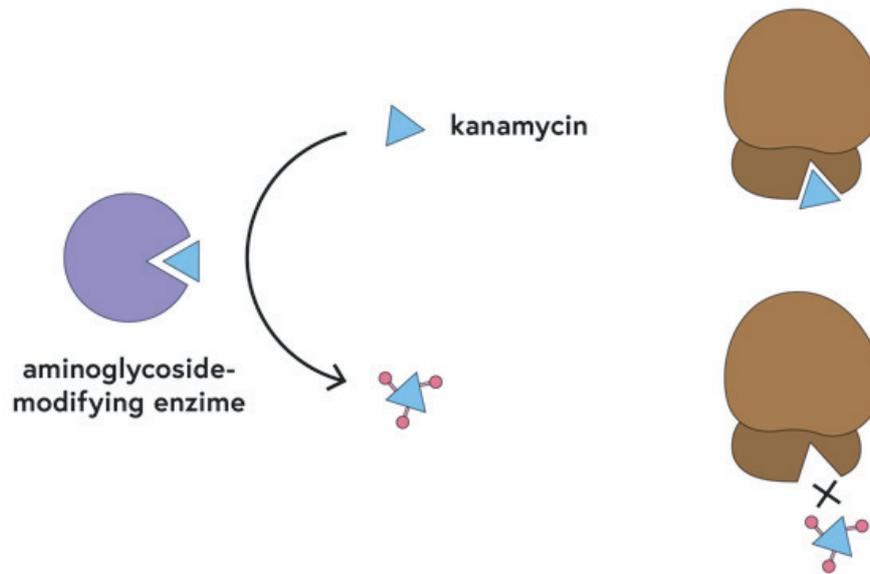
Modifikasi oleh enzim merupakan mekanisme resistansi lainnya yang dimediasi oleh bakteri yang menghasilkan enzim. Pertama, bakteri dapat memproduksi enzim yang secara kimiawi mengubah target antibiotik dalam bakteri dengan menambahkan kelompok kimia tambahan. Contohnya adalah gen *erm* (*erythromycin ribosomal methylation*) yang memberikan resistansi terhadap antibiotik makrolida seperti eritromisin. Enzim metilat ini

(menambahkan gugus metil: CH_3) ke bagian ribosom, yang merupakan target eritromisin. Ini berarti eritromisin tidak dapat lagi mengikat ke targetnya, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4, yang berarti bakteri dapat terus berkembang dengan adanya antibiotik.

Jenis kedua enzim bekerja dengan memodifikasi secara kimia antibiotik itu sendiri, yang mencegah pengikatan antibiotik ke situs targetnya. Contoh dari hal ini adalah enzim pengubah aminoglikosida seperti N-asetiltransferase, yang menambahkan gugus asetil tambahan (CH_3CO) ke antibiotik aminoglikosida seperti kanamisin. Seperti yang diilustrasikan pada Gambar 5, antibiotik berhenti mengikat ribosom, yang berarti bakteri menjadi resistan. Ada banyak jenis enzim yang memiliki aktivitas berbeda terhadap antibiotik dari berbagai kelas antibiotik termasuk aminoglikosida, tetrasiklin, fenikol, dan linkosamid.



Gambar 4 Enzim memodifikasi ribosom dengan menambahkan gugus metil/ CH_3 pada situs/tempat target antibiotik makrolida (eritromisin) ⁽²⁾



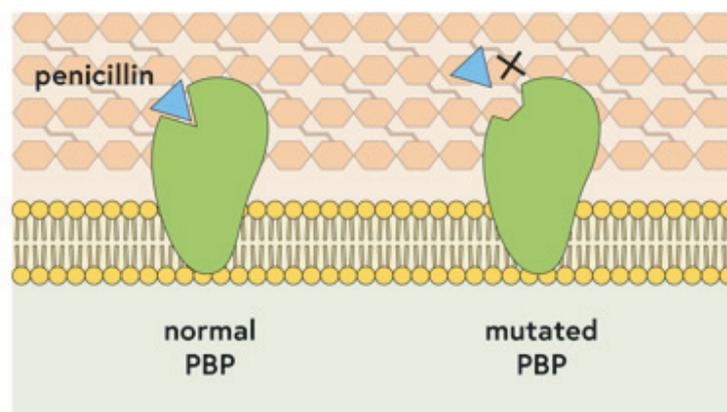
Gambar 5 Enzim memodifikasi antibiotik aminoglikosida (kanamisin) dengan menambahkan gugus asetil/ CH_3CO ⁽²⁾

2. Modifikasi situs/tempat target antibiotik

Mekanisme umum yang digunakan bakteri untuk menjadi resistan terhadap antibiotik adalah dengan memodifikasi target antibiotik. Ketika bakteri tumbuh dan bereplikasi mereka menyalin materi genetik (genom). Ketika bakteri menyalin materi genetik, kadang-kadang terjadi kesalahan dalam sekuens DNA (misal A akan diganti dengan C). Jika salah satu mutasi ini terjadi pada lokasi gen yang menyandi protein yang merupakan target antibiotik, maka mutasi ini menyebabkan antibiotik tidak dapat lagi mengikat ke target dan menjadi resistan. Ini berarti bahwa bakteri dengan mutasi akan memiliki keuntungan pertumbuhan dan akan

bertahan hidup dengan keberadaan antibiotik sementara sisa populasi akan mati. Ini adalah mekanisme umum untuk resistansi penisilin terhadap *Streptococcus pneumoniae*, dimana diperolehnya mutasi pada penisilin pengikat protein (*penicillin binding proteins*, PBP) yang merupakan target penisilin. Adanya mutasi dalam PBP berarti bahwa penisilin tidak dapat lagi mengikat dan membunuh bakteri. Ini terlihat pada Gambar 6.

Demikian pula resistansi pada banyak patogen bakteri terhadap antibiotik fluorokuinolon seperti siprofloksasin dimediasi oleh mutasi pada gen DNA *gyrase* dan DNA *topoisomerase* IV, yang merupakan target siprofloksasin ^(11, 15).



Gambar 6 Mutasi yang terjadi pada situs/tempat target protein antibiotik (*penicillin binding proteins*, PBP) ⁽²⁾

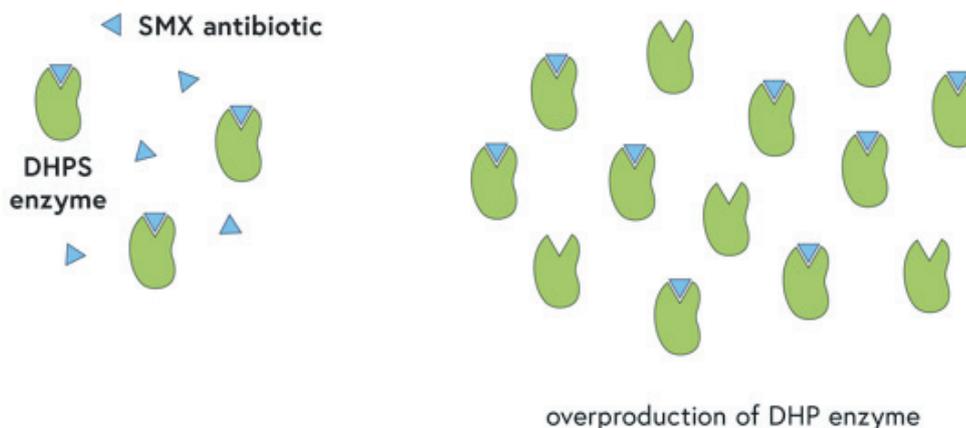
3. Overproduksi dari target

Bakteri juga dapat memproduksi target antibiotik secara berlebih, yang berarti ada kelebihan target protein dari antibiotik dibandingkan dengan antibiotik itu sendiri. Dengan kata lain, ada cukup protein target untuk melanjutkan perannya di dalam sel. Ini merupakan mekanisme resistansi terhadap trimethoprim pada *Escherichia coli* dan *Haemophilus influenzae*. Ekspresi berlebih kadang-kadang ditemukan dalam kombinasi dengan mutasi yang menurunkan kemampuan antibiotik untuk mengikat pada targetnya, seperti yang terlihat pada Gambar 7.

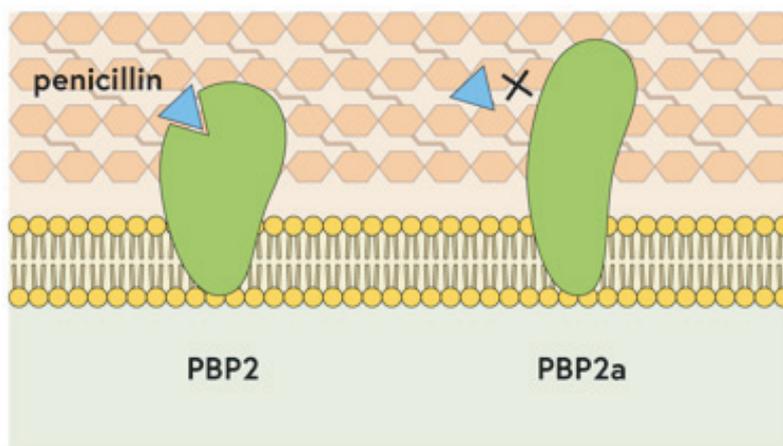
4. Penggantian situs/tempat target

Sementara bakteri seperti *Streptococcus pneumoniae* mengubah target antibiotik,

mekanisme resistansi lain yang serupa adalah mendapatkan salinan gen tambahan yang menyalin protein yang masih mempertahankan aktivitas dengan adanya antibiotik. Ini bagaimana *Staphylococcus aureus* patogen menjadi resistan terhadap sebagian besar antibiotik β -laktam seperti penisilin. *Methicilin Resistance Staphylococcus Aureus* (MRSA) yang resistan terhadap metisilin, menjadi resistan dengan mendapatkan salinan tambahan penisilin pengikat protein 2a (*penicillin binding protein 2a*, PBP2a), yang merupakan target antibiotik β -laktam. Ini membuat penisilin pengikat protein 2a yang masih dapat berfungsi walaupun dengan adanya antibiotik β -laktam.



Gambar 7 Produksi berlebih dari protein target di dalam sel bakteri ⁽²⁾



Gambar 8 MRSA resistan terhadap antibiotik β -laktam karena mendapatkan salinan tambahan PBP2a ⁽²⁾

5. Efluks dan mengurangi permeabilitas

Beberapa spesies bakteri secara intrinsik resistan terhadap beberapa antibiotik melalui penurunan permeabilitas dan pompa efluks. Selain itu, bakteri dapat memperoleh pompa efluks tambahan yang secara khusus memompa satu jenis antibiotik, misalnya pompa efluks TetA yang secara khusus memompa tetrasiklin dari sel. Sama halnya, permeabilitas sel dapat diubah dengan perolehan mutasi pada porin (saluran protein melalui membran sel). Mutasi ini dapat mencakup kehilangan porin, modifikasi ukuran atau konduktansi saluran porin, atau tingkat ekspresi yang lebih rendah dari porin. Pada akhirnya, kedua mekanisme, baik pompa efluks maupun penurunan permeabilitas, dapat menurunkan konsentrasi antibiotik intraseluler dalam sel bakteri baik dengan memompa keluar antibiotik maupun mencegahnya masuk ke dalam sel, seperti yang terlihat pada Gambar 2.

IV. Mutasi kromosomal dan rekombinasi

1. Reproduksi klonal bakteri

Sel bakteri bereproduksi secara klonal. Selama reproduksi klon, setiap sel nenek moyang bakteri (*bacterial progenitor cell*) menyalin DNA-nya dengan kesetiaan yang tinggi sebelum membelah menjadi dua sel baru (keturunan), masing-masing dengan satu salinan genom. Kesalahan acak dalam replikasi DNA dapat terjadi selama proses ini, menghasilkan keturunan klon yang akan mewarisi 'kesalahan' replikasi dalam DNA mereka. Kesalahan ini dikenal sebagai mutasi.

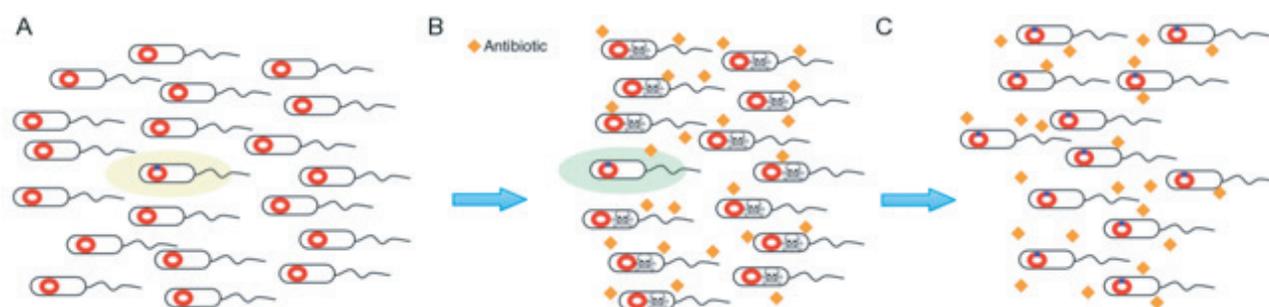
2. Pemilihan mutan yang resistan terhadap antibiotik

Umumnya mutasi jarang terjadi, namun karena populasi sel bakteri berkembang biak secara eksponensial, kemungkinan sel mutan ada di dalam suatu populasi (Gambar 9A). Secara kebetulan, beberapa sel mutan ini bisa resistan terhadap antibiotik, misalnya, jika mutasi mengubah target antibiotik (atau melalui

mekanisme lain yang dijelaskan sebelumnya). Tanpa adanya antibiotik, sel-sel mutan hanya akan pernah ada sebagai proporsi kecil dari total populasi (sekitar 1 dalam satu miliar sel) atau sekitar 10^6 sampai 10^9 *colony-forming unit* (CFU) (Gambar 9A) (25). Dengan adanya antibiotik, semua sel bakteri kecuali mutan yang resistan antibiotik akan mati (Gambar 9B). Dalam konteks ini, mutasi yang resistan antibiotik memberi keuntungan adaptif dan sel-sel yang kebal antibiotik mampu tumbuh dan berkembang biak. Seiring waktu, populasi bakteri baru akan terdiri dari sebagian besar (atau seluruhnya) sel mutan yang resistan antibiotik (Gambar 9C).

Resistensi melalui mutasi pada DNA kromosom adalah pendorong utama resistansi yang diperoleh pada spesies bakteri tertentu, seperti *Mycobacterium tuberculosis* dan *Helicobacter pylori*, atau untuk antibiotik tertentu, terutama antibiotik sintetis seperti fluorokuinolon dan oksazolidinon. Mutasi yang resistansi antibiotik dapat ditransmisikan "secara vertikal" dengan reproduksi klon, seperti yang dijelaskan di atas, tetapi juga "horizontal" melalui rekombinasi⁽⁷⁾.

Bakteri dapat bertukar DNA menggunakan rekombinasi yang dimediasi oleh mekanisme yang meliputi transduksi (transfer DNA dari satu sel ke sel lainnya oleh bakteriofag), transformasi (penyerapan DNA eksogen dari lingkungan sekitarnya) atau konjugasi (transfer DNA dari satu bakteri ke bakteri lain melalui kontak sel ke sel)⁽¹²⁾. Beberapa spesies bakteri, seperti *Helicobacter pylori*, cukup sering bergabung kembali, sedangkan yang lain, seperti *M. tuberculosis*, tidak bergabung kembali. Rekombinasi dapat membawa banyak perubahan genetik (mutasi) dari donor ke penerima. Sebagai kesimpulan, mutasi yang diperoleh oleh bakteri dengan demikian merupakan hasil dari mutasi yang diturunkan secara vertikal dan mutasi yang didapat secara horizontal melalui rekombinasi.



Gambar 9 Sel-sel mutan di dalam populasi bakteri dengan atau tanpa adanya antibiotik ⁽²⁾

Resistensi melalui mutasi pada DNA kromosom adalah pendorong utama resistansi yang diperoleh pada spesies bakteri tertentu, seperti *Mycobacterium tuberculosis* dan *Helicobacter pylori*, atau untuk antibiotik tertentu, terutama antibiotik sintetis seperti fluorokuinolon dan oksazolidinon. Mutasi yang resistansi antibiotik dapat ditransmisikan "secara vertikal" dengan reproduksi klon, seperti yang dijelaskan di atas, tetapi juga "horizontal" melalui rekombinasi ⁽⁷⁾.

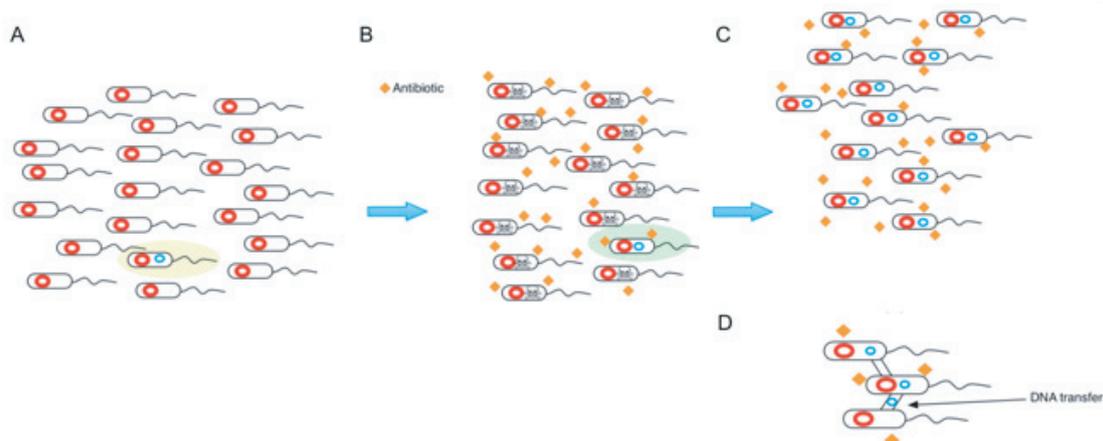
Bakteri dapat bertukar DNA menggunakan rekombinasi yang dimediasi oleh mekanisme yang meliputi transduksi (transfer DNA dari satu sel ke sel lainnya oleh bakteriofag), transformasi (penyerapan DNA eksogen dari lingkungan sekitarnya) atau konjugasi (transfer DNA dari satu bakteri ke bakteri lain melalui kontak sel ke sel) ⁽¹²⁾. Beberapa spesies bakteri, seperti *Helicobacter pylori*, cukup sering bergabung kembali, sedangkan yang lain, seperti *M. tuberculosis*, tidak bergabung kembali. Rekombinasi dapat membawa banyak perubahan genetik (mutasi) dari donor ke penerima. Sebagai kesimpulan, mutasi yang diperoleh oleh bakteri dengan demikian merupakan hasil dari mutasi yang diturunkan secara vertikal dan mutasi yang didapat secara horizontal melalui rekombinasi.

3. Plasmid

Plasmid adalah potongan kecil dari DNA ekstrakromosomal sirkular pada bakteri ⁽²⁴⁾. Mereka mampu menyalin diri di dalam sel bakteri secara independen dari kromosom (replikasi

diri) dan ada dalam beberapa salinan. Beberapa dapat diintegrasikan ke dalam kromosom. Plasmid dapat mentransfer dari satu sel ke sel lain melalui kontak sel ke sel, suatu proses yang disebut konjugasi ⁽²⁷⁾. Plasmid penting karena mereka dapat bergerak di antara sel-sel bakteri yang berbeda, termasuk *strain* dari spesies yang sama bahkan antara spesies bakteri yang berbeda. Plasmid membawa banyak gen, dalam beberapa kasus gen yang menyebabkan penyakit dan resistansi antibiotik ⁽²⁰⁾.

Plasmid dipertahankan dalam populasi bakteri dengan cara sel bakteri dapat membawa atau memperoleh plasmid yang mengkode sebuah protein yang memberikan resistansi terhadap antibiotik ^(12, 26). Plasmid mungkin ada di semua sel maupun hanya beberapa dalam populasi bakteri (Gambar 10A). Dengan adanya suatu antibiotik, semua sel bakteri kecuali yang membawa plasmid akan mati (Gambar 10B). Dalam konteks ini, plasmid memberi keuntungan adaptif dan sel-sel yang resistan antibiotik mampu tumbuh dan berkembang biak. Seiring waktu, populasi bakteri baru akan terdiri dari sebagian besar (atau seluruhnya) sel pembawa plasmid yang resistan antibiotik (Gambar 10C). Plasmid yang membawa gen resistansi antibiotik kini telah meningkat dalam prevalensi, dan dapat ditransfer ke populasi bakteri lain melalui konjugasi (Gambar 10D).



Gambar 10 Sel yang mengandung plasmid pembawa gen resistansi di dalam suatu populasi bakteri dengan atau tanpa adanya antibiotik dan proses transfer gen resistansi oleh plasmid melalui konjugasi ⁽²⁾

4. Transposon

Transposon adalah elemen genetik bergerak yang otonom (*autonomous mobile genetic elements*). Mereka biasanya ditemukan terintegrasi dalam kromosom inang dan mengandung gen yang memungkinkan mereka untuk berintegrasi dan memotong (transposisi) dari kromosom. Mereka diperbanyak secara pasif selama replikasi kromosom, segregasi, dan pembelahan sel.

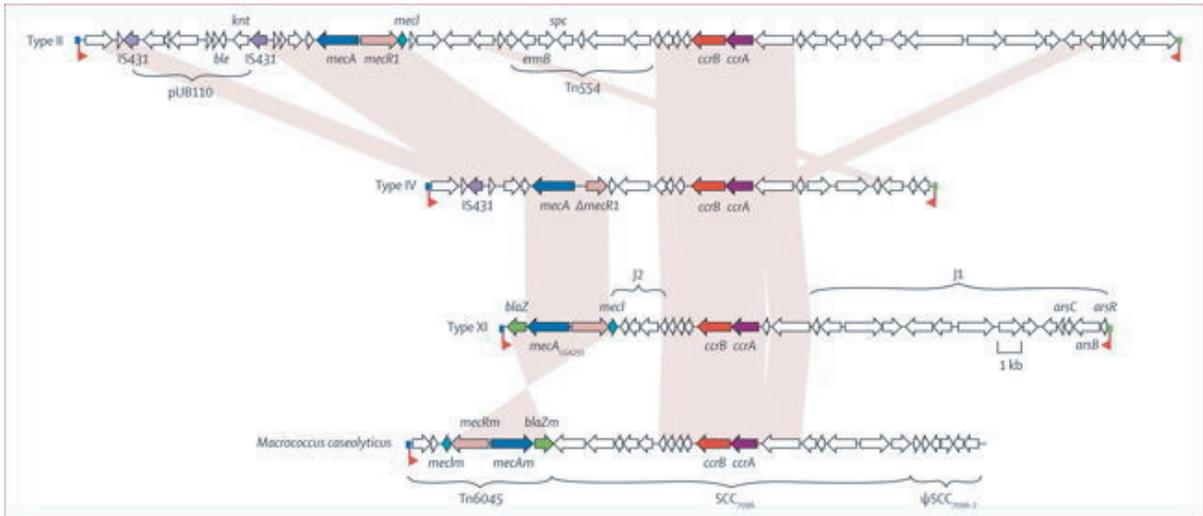
Selain mampu bergerak ke berbagai situs/ tempat DNA dalam sel yang sama, beberapa mekanisme penyandian untuk transfer antar sel. Dalam hal ini, mereka disebut elemen integratif dan konjugatif (*integrative and conjugative elements, ICE*), juga disebut transposon konjugatif. Ada dua karakteristik mendefinisikan ICE: (a) mereka ditemukan terintegrasi dalam genom inang; dan (b) mereka menyandi sistem konjugasi fungsional yang memungkinkan transfernya ke sel lain ⁽²⁸⁾.

Seperti halnya dengan plasmid dan bakteriofag, banyak transposon membawa gen kargo dengan fungsi yang tidak terkait dengan siklus hidup transposon, yaitu transposisi dan transfer. Gen kargo ini dapat memberikan beberapa manfaat bagi sel inang, seperti resistansi antibiotik. Transposon biasanya mosaik dan modular, yang terbuat dari modul atau “potongan” dari transposon lain dan

elemen genetik bergerak. Transposon sendiri sering menjadi bagian dari elemen genetik bergerak lainnya ⁽²³⁾.

5. Mekanisme campuran

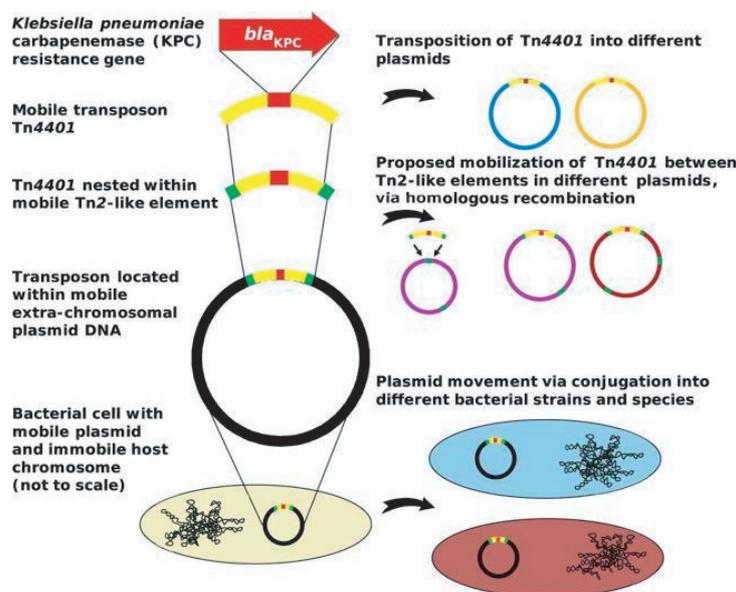
Gen resistansi dapat dimobilisasi di dalam atau di antara sel-sel bakteri menggunakan kombinasi mekanisme yang telah dijelaskan sebelumnya. Gen resistansi tertentu dapat diapit oleh transposon yang memungkinkannya untuk 'melompat' dari kromosom bakteri ke plasmid atau sebaliknya, dalam sel yang sama ⁽²⁶⁾. Sebagai contoh, *strain* MRSA yang resistansi terhadap metisilin mengandung gen resistansi metisilin (*methicillin resistance gene, mecA*) di dalam elemen genetik bergerak yang disebut *mec* kromosom kaset *staphylococcal (staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec)*. SCCmec memiliki struktur kompleks dengan gen *mecA* diapit oleh transposon yang, pada gilirannya, dimasukkan ke dalam kromosom (Gambar 11) ⁽¹⁴⁾. Ada berbagai jenis elemen SCCmec yang diidentifikasi dalam MRSA dengan beberapa membawa gen resistansi tambahan ⁽¹⁹⁾. Karena dalam kebanyakan kasus elemen SCCmec dimasukkan ke dalam kromosom, ia dapat menyebar dengan mudah melalui transmisi vertikal.



Gambar 11 Perbandingan berbagai jenis elemen SCCmec. Gen yang terkait dengan resistansi ditandai dengan panah yang mewakili arah transkripsi. Daerah berwarna yang menghubungkan jenis SCCmec menunjukkan daerah yang dikonservasi. Elemen SCCmec membawa berbagai jenis elemen transposable mengapit gen resistansi ⁽²⁾

Enterobacteriaceae yang resistansi terhadap karbapenem juga mengandung elemen genetik bergerak modular. Sebuah studi yang dilakukan lebih dari 5 tahun di satu rumah sakit di Amerika Serikat mengungkapkan mekanisme berbeda yang berperan untuk transmisi gen resistansi karbapenem ⁽²⁹⁾. Gen *bla_{KPC}* memberikan resistansi terhadap karbapenem yang merupakan salah satu antibiotik pilihan terakhir. Penyebaran *bla_{KPC}* terjadi pada

berbagai tingkat genetik dengan berbagi cepat plasmid *bla_{KPC}* antara strain dan spesies bersama-sama dengan sering melompat dari transposon Tn4401 antara berbagai plasmid (Gambar 12). Selain itu, Tn4401 dimasukkan ke dalam transposon Tn2 lain, yang selanjutnya meningkatkan mobilitas gen resistansi di antara berbagai plasmid. Semua mekanisme ini menyebabkan peningkatan cepat dalam tingkat resistansi karbapenem.

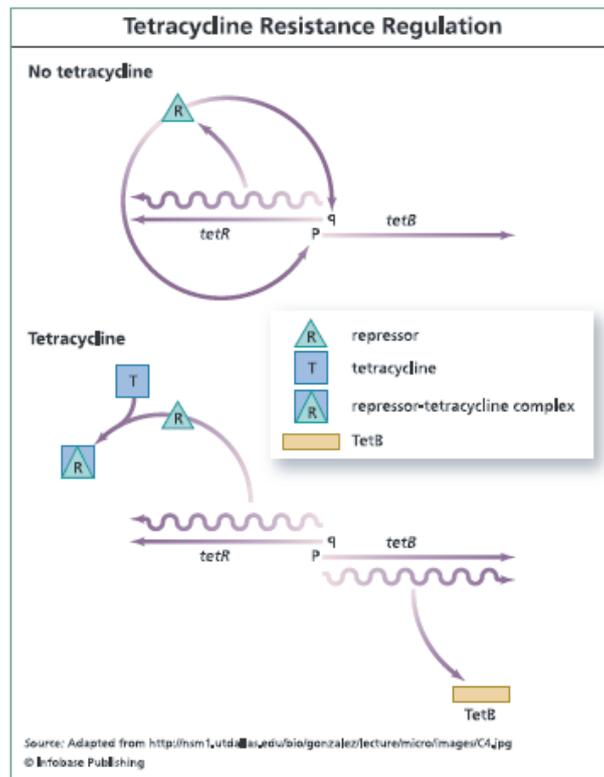


Gambar 12 Penyebaran elemen *bla_{KPC}* dari berbagai tingkat mengarah ke penyebaran di antara strain *Enterobacteriaceae* ⁽²⁾

IV. Mekanisme Pengaturan Resistansi Antibiotik

Salah satu aspek resistansi yang sering diabaikan adalah mekanisme yang mengatur gen resistansi antibiotik. Sering kali ditemukan bakteri memiliki gen resistan tertentu melalui pengujian molekuler (genotip), akan tetapi pengujian secara fenotip tidak resistan. Salah satu contoh dari kasus ini yang paling banyak dipelajari atau diteliti adalah pengaturan gen yang menyandi suatu pompa yang menghilangkan/meniadakan tetrasiklin dari sel. Pompa ini hanya akan aktif jika tetrasiklin ada di dalam sel. Jika tetrasiklin tidak ada, suatu protein yang disebut sebagai *repressor* akan mengikat DNA di samping gen resistansi tetrasiklin. Ikatan *repressor* ini akan mencegah aktivasi (transkripsi) dari gen resistansi dan pompa protein. Akan tetapi, jika tetrasiklin

ada maka tetrasiklin akan mengikat *repressor* membentuk kompleks tetrasiklin-*repressor* dan mengubah bentuk *repressor* sehingga tidak lagi mengikat DNA di sebelah gen resistansi tetrasiklin. Ini akan mengaktifkan gen resistansi tetrasiklin dan memproduksi protein resistansi tetrasiklin. Pada akhirnya jika konsentrasi tetrasiklin di dalam sel cukup rendah, maka akan kembali pada kondisi dimana *repressor* hanya mengikat DNA dan protein resistansi tetrasiklin tidak diproduksi⁽²⁴⁾. Dari studi ini bisa disimpulkan bahwa bakteri mungkin mengandung gen resistansi terhadap antibiotik yang hanya dapat diaktifkan jika ada antibiotik (dalam kadar tertentu) yang menstimulasi *repressor* untuk memproduksi protein resistansi antibiotik. Oleh karena itu bisa jadi pengujian molekuler (secara genotip) ditemukan gen resistan, namun dikategorikan tidak resistan atau *intermediate resistant* secara fenotip.



Gambar 13 Mekanisme pengaturan resistensi tetrasiklin. Ketiadaan tetrasiklin menyebabkan tetrasiklin repressor (*tetR*) mengikat DNA dan mencegah tetrasiklin protein (TetB) diproduksi. Jika antibiotik (tetrasiklin) ada maka akan berikatan dengan *tetR* dan TetB akan diproduksi⁽²⁴⁾.

Kesimpulan

Antimikroba, khususnya antibiotik memegang peranan yang sangat penting dalam pengobatan infeksi bakteri patogen baik pada manusia maupun hewan. Akan tetapi penggunaan antibiotik yang tidak sesuai dapat menyebabkan terjadinya resistansi terhadap bakteri. Resistansi Antimikroba memungkinkan bahwa pengobatan infeksi bakteri patogen menjadi sangat terbatas bahkan sulit untuk diobati. Secara alami bakteri resistan terhadap antibiotik atau keluarga antibiotik tertentu, tanpa adanya mutasi atau mendapatkan gen lebih lanjut, resistansi ini dikenal dengan resistansi intrinsik. Ini berarti bahwa antibiotik tersebut tidak dapat digunakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh spesies bakteri itu, seperti *Pseudomonas aeruginosa* yang resistan terhadap sebagian besar antibiotik β -laktam. Selain itu, bakteri patogen dapat memperoleh gen dan mutasi yang memediasi resistansi terhadap antibiotik, yang dikenal dengan resistansi ekstrinsik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Beth EK, Heather T, Jodie RP... et.al. 2017. National antimicrobial resistance monitoring system: two decades of advancing public health through integrated surveillance of antimicrobial resistance. *Foodborne Pathogens and Disease* 20:20: 1-13.
2. Blane B, Harrison E, Coll F... et.al. 2020. Online Course: Bacterial Genomes: Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens. Welcome Genome Campus in association with Future Learn. <https://coursesandconferences.llcomegenomecampus.org/> (diunduh pada tanggal 4 Mei 2020)
3. Boeckel TPV, Glennon E, Chen D... et.al. 2017. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* 357(6358): 1350-1352.
4. Boeckel TPV, Pires J, Silvester R... et.al. 2019. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. *Science* 365(6459): 1-5.
5. Brouwer MSM, Bossers A, Harders F... et.al. 2014. Complete Genome sequences of Inc11 plasmids carrying extended-spectrum AmpC β -lactamase genes. *Genome Announcements* 2-4: 1-2.
6. Centres for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Atlanta*. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (diunduh pada tanggal 5 April 2020).
7. Chang WL, Yu Z, Zhuang ZK... et.al. 2020. Vertical transmission of *Salmonella enteritidis* with heterogeneous antimicrobial resistance from breeding chickens to commercial chickens in China. *Veterinary Microbiology* 240: 1-6.
8. Coll F, Harrison EM, Toleman MS... et.al. 2017. Longitudinal genomic surveillance of MRSA in the UK reveals transmission patterns in hospitals and the community. *Science Translation Medicine*. 25;9 (413).
9. Crump JA, Maria SK, Gordon MA... et.al. 2015. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 28(4): 901-937.
10. Fernandes, Amador RF, Prudêncio PA... et.al. 2013. β -lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology* 24-1: 7-17.
11. Ferrari R, Magnani M, and Souza RB. 2010. Mutant Prevention Concentration (MPC) of ciprofloxacin against *Salmonella enterica* of epidemic and poultry origin. *Current Microbiology* 62:628-632.
12. Fischer EAJ, dieirikx CM, Vessen-Zanbergen A...et.al. 2019. Competition between *Escherichia coli* populations with and without plasmids carrying a gene encoding extended-spectrum beta-lactamase in the broiler chicken gut.

- Applied and Environmental Microbiology* 85:17: 1-12.
13. Frost I, Boeckel TPV, Pires J... et.al. 2019. Global Geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *Journal of Travel Medicine*: 1-13.
 14. García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H... et al. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 11, 595–603.
 15. Govendir M, Hansen T, Kimble B... et.al. 2009. Susceptibility of rapidly growing *Mycobacteria* isolated from cats and dogs, to ciprofloxacin, enrofloxacin, and moxifloxacin. *Veterinary Microbiology* 147: 113-118.
 16. Hay SI, Rao PC, Dolecek C... et.al. 2018. Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. *BMC Medicine* 16(78): 1-3.
 17. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A... et.al. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 9;387(10014):176-87
 18. Hopkins AL, Paolini GV. 2007. Chemogenomics in drug discovery – the druggable genome and target class properties. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*: 4, 421-433.
 19. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). 2009 Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(12):4961-7.
 20. Kirchner M, Wearing H, Teale C. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Veterinary Microbiology* 148: 434-435.
 21. Livermore DM, Hope R, Reynolds R... et.al. 2013. Declining cephalosporin and fluoroquinolone non-susceptibility among bloodstream *Enterobacteriaceae* from the UK: links to prescribing change?. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 68: 2667–74.
 22. Ludden C, Raven KE, Jamrozny D... et.al. 2019. One health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *mBio*. Jan 22;10(1).
 23. McMillan EA, Gupta SK, Williams LE... et.al. 2019. Antimicrobial resistance genes, cassettes, and plasmids present in *Salmonella enterica* associated with united states food animals. *Frontiers in Microbiology* 10-832: 1-18.
 24. Patrick G. Guilfoile. 2007. Antibiotic-Resistance Bacteria. *Chelsea House Publishers*. pp. 50-57.
 25. Phokarel S, Raut S, and Adhikari B. 2019. Tackling antimicrobial resistance in low-income and middle-income countries. *BMJ Global Health* 4: 1-3.
 26. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J... et.al. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73: 1121-1137.
 27. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Gras LM... et.al 2019. Successful host adaptation of IncK2 plasmids. *Frontiers on Microbiology* 10: 1-9.
 28. Sekyere JO, Asante J. 2018. Emerging mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria and fungi: advances in the era of genomics. *Future Microbiology* 1-22.
 29. Sheppard AE, Stoesser N, Wilson DJ... et.al. 2016. Nested Russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene bla KPC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60: 3767–3778.

30. Shivaramu Keelara, Siddharta Thakur. 2014. Dissemination of plasmid-encoded AmpC β -lactamases in antimicrobial resistant *Salmonella* serotypes originating from humans, pigs, and the swine environment. *Veterinary Microbiology* 173: 76-83.
31. Stone RL, , Masi M, Phetsang W... et.al. 2019. Fluoroquinolone-derived fluorescent probes for studies of bacterial penetration and efflux. *The Royal Society of Chemistry*: 1-6.
32. Stone RL, Bbutler MS, Phetsang W... et.al. 2018. Fluorescent antibiotics: new research tools to fight antibiotic resistance. *Trends in Biotechnology*: 1-14.
33. Wang J, Li X, Li J... et.al. 2017. Complete genetic analysis of a *Salmonella enterica* serovar Indiana isolate accompanying four plasmids carrying *mcr-1*, ESBL and other resistance genes in China. *Veterinary Microbiology* 210: 142-146.
34. Wasyl D. Hoszowski A. and Zajac M. 2014. Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanism in *Salmonella* spp. *Veterinary Microbiology* 171: 307-314.
35. Yue L, Jiang HX, Liao XP... et.al. 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. 2008. *Veterinary Microbiology* 132: 4141-420.

ESTIMASI KETIDAKPASTIAN PENGUKURAN UJI KADAR SIPIROFLOKSASIN SEDIAAN SERBUK DENGAN MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis

Maria Fatima Palupi, Rosana Anita Sari, Ambarwati

Unit Uji Farmasetik dan Premiks
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340
Email : lupi_ima@yahoo.co.id

ABSTRAK

Estimasi ketidakpastian merupakan salah satu persyaratan yang harus dipenuhi dalam ISO 17025:2017. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui estimasi ketidakpastian pengukuran kadar obat hewan sipiroflokasin sediaan serbuk dengan metode uji menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Faktor-faktor yang diperhitungkan dalam sebagai sumber ketidakpastian pengujian kadar sipiroflokasin antara lain (1) konsentrasi sampel sipiroflokasin, (2) konsentrasi standar sipiroflokasin, (3) serapan sampel sipiroflokasin, (4) serapan standar sipiroflokasin, dan (5) linearitas pengukuran. Berdasarkan hasil perhitungan berbagai alat dan faktor yang mempengaruhi pengujian kadar sipiroflokasin didapatkan estimasi ketidakpastian kadar sipiroflokasin serbuk dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis adalah 0.046%. Hal ini menunjukkan, rentang kisaran yang didalamnya terletak nilai benar dari sifat yang diukur relatif kecil sehingga ada kedekatan antara nilai hasil uji dengan nilai yang sebenarnya.

Kata kunci: ketidakpastian, sipiroflokasin, kadar

ABSTRACT

Uncertainty estimation is one of the requirements that must be met in ISO 17025: 2017. This study aims to determine the uncertainty of measuring the drug contents of ciprofloxacin in powder preparations using a test method using a UV-Vis spectrophotometer. Factors taken into account as a source of uncertainty in the testing of ciprofloxacin content include (1) concentration of ciprofloxacin samples, (2) concentrations of ciprofloxacin standards, (3) absorption of ciprofloxacin samples, (4) absorption of ciprofloxacin standards, and (5) measurement linearity. Based on the results of the calculation of various equipments and factors that influence the testing of ciprofloxacin contents, it is estimated that the uncertainty value of ciprofloxacin contents of the powder using a spectrophotometer UV-Vis is 0.046%. This shows, the range within which lies the true value of the measured content is relatively small so that there is a closeness between the value of the test results with the actual value.

Keywords: uncertainty, ciprofloxacin, content

PENDAHULUAN

Estimasi ketidakpastian merupakan salah satu klausul dalam ISO/IEC:17025:2017 yang harus dipenuhi oleh laboratorium pengujian⁽⁴⁾. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) merupakan laboratorium pengujian yang telah terakreditasi ISO/IEC:17025:2017. Salah satu ruang lingkup yang telah mendapatkan akreditasi adalah pengujian kadar siprofloksasin dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebagai laboratorium pengujian, BBPMSOH harus secara konsisten melaksanakan dan memenuhi semua klausul yang dipersyaratkan dalam ISO/IEC:17025:2017, dan salah satunya adalah adanya estimasi nilai ketidakpastian pengukuran dari suatu metode uji yang digunakan.

Dalam ISO/IEC:17025:2017 dengan jelas menjabarkan bahwa laboratorium harus mengidentifikasi kontribusi terhadap ketidakpastian pengukuran. Ketika melakukan evaluasi ketidakpastian pengukuran, semua kontribusi yang signifikan, termasuk yang timbul dari pengambilan sampel, harus diperhitungkan dengan menggunakan analisis yang tepat^(1,4,6). Lebih lanjut dalam klausul 7.6.3 ISO/IEC:17025:2017 disebutkan bahwa laboratorium yang melakukan pengujian harus mengevaluasi ketidakpastian pengukuran. Bila metode uji tidak memungkinkan evaluasi ketidakpastian pengukuran yang ketat, estimasi harus dilakukan berdasarkan pemahaman prinsip-prinsip teoritis atau pengalaman praktis dari kinerja tersebut⁽⁴⁾.

Ketidakpastian adalah parameter yang berhubungan dengan hasil suatu pengujian dan/atau kalibrasi, yang memberikan gambaran penyebaran dari nilai pengujian dan/atau kalibrasi^(3,7). Adapun menurut Kantasubrata (2014), ketidakpastian pengukuran merupakan parameter yang menetapkan rentang nilai yang didalamnya diperkirakan nilai benar yang diukur berada. Tujuan pengukuran adalah menentukan nilai ukur, yaitu nilai suatu besaran tertentu

yang diukur⁽³⁾. Hasil pengukuran sebenarnya merupakan nilai taksiran dari suatu nilai ukur tertentu, dimana dalam proses taksiran tersebut terdapat kesalahan baik yang sistematis maupun acak yang dapat mempengaruhi taksiran nilai ukur yang diperoleh. Pengukuran hasil uji akan lengkap bila juga dicantumkan nilai estimasi ketidakpastian pengukuran. Penulisan hasil uji yang disertai ketidakpastian pengukuran, menunjukkan derajat dari ketelitian pengujian^(2,3,5).

Nilai ketidakpastian memungkinkan pengguna data hasil uji untuk mengevaluasi kehandalan data serta mengevaluasi kesesuaian dengan data hasil uji terhadap tujuan penggunaannya. Laboratorium wajib mencantumkan hasil estimasi ketidakpastian pengukuran apabila diminta oleh pengguna jasa laboratorium. Nilai ketidakpastian juga menyatakan mutu hasil pengukuran atau pengujian, semakin kecil nilai ketidakpastian maka semakin baik hasil pengujian^(2,6).

Salah satu pengujian yang telah mendapatkan akreditasi ISO/IEC 17025:2017 di BBPMSOH adalah pengujian kadar siprofloksasin sediaan serbuk. Oleh sebab itu, perlu adanya perhitungan penentuan estimasi ketidakpastian pada pengujian kadar siprofloksasin sediaan serbuk dengan metode yang menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Tujuan dari perhitungan estimasi ketidakpastian ini adalah untuk mengetahui rentang nilai didalam uji kadar siprofloksasin diperkirakan dari nilai benar hasil uji kadar siprofloksasin yang bermakna secara ilmiah.

MATERI DAN METODE

MATERI

Peralatan yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV Probe 1800), kuvet, timbangan analitik yang terkalibrasi (Shimadzu Libror, Japan), pipet ukur 1 mL, 5 mL, 9 mL, dan 10 mL yang terkalibrasi, dan labu ukur 100 mL yang terkalibrasi. Bahan yang digunakan adalah standar *certified*

reference material siprofloksasin (Sigma, USA), sampel obat hewan serbuk yang mengandung siprofloksasin 10%, pelarut NaOH 0,1N, dan *Destilated Water* (DW).

METODE

Metode uji menggunakan metode internal BBPMSOH yang telah diakreditasi yaitu IKP-FAR.719.

1. Preparasi Standar dan Sampel

Preparasi Standar

Standar siprofloksasin (98%) ditimbang 10,20 mg dengan timbangan analitik elektronik, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dilarutkan dengan pelarut NaOH 0,1N sebanyak 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL (Larutan Standar 1). Larutan standar 1 diambil 1 mL dan diencerkan dengan 9 mL DW (Larutan Standar 2). Larutan standar 2 diambil 1 mL dan diencerkan dengan 9 mL DW sehingga didapatkan Larutan standar 3. Larutan standar 3 diambil 5 mL dan diencerkan dengan 5 mL DW sehingga didapatkan konsentrasi akhir standar 5 µg/mL.

Preparasi Sampel

Sampel obat hewan siprofloksasin serbuk ditimbang 1 g (setara dengan 100 mg siprofloksasin) dengan timbangan elektronik kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang terkalibrasi. Sampel siprofloksasin dilarutkan dengan pelarut NaOH 0,1N hingga batas tera labu takar tersebut sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL (Larutan Sampel 1). Larutan sampel 1 kemudian diambil 1 mL dan diencerkan dengan DW 9 mL (larutan sampel 2). Larutan sampel 2 diambil 1 mL dan diencerkan dengan DW 9 mL (Larutan sampel 3). Larutan sampel 3 diambil 5 mL dan diencerkan dalam 5 mL DW sehingga konsentrasi akhir larutan sampel adalah 5 µg/mL.

2. Penentuan kadar siprofloksasin serbuk dengan spektrofotometer UV-Vis

Penentuan kadar siprofloksasin dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer

UV-Vis yang telah dikalibrasi. Cara perhitungan adalah dengan membandingkan serapan pengenceran terakhir sampel dan standar pada konsentrasi sampel dan standar yang telah diketahui pada panjang gelombang maksimum (270 nm ± 2 nm). Hasil kadar siprofloksasin dihitung dengan menggunakan formulasi rumus:

$$\% \text{ Kadar siprofloksasin} = \frac{Abs_{spl}}{Abs_{std}} \times \frac{C_{std}}{C_{spl}} \times 100\% \text{ (rumus 1)}$$

Keterangan:

Abs spl = serapan sampel

Abs std = serapan standar

Cstd = konsentrasi standar yang diukur

Cspl = konsentrasi sampel yang diukur

3. Identifikasi Ketidakpastian

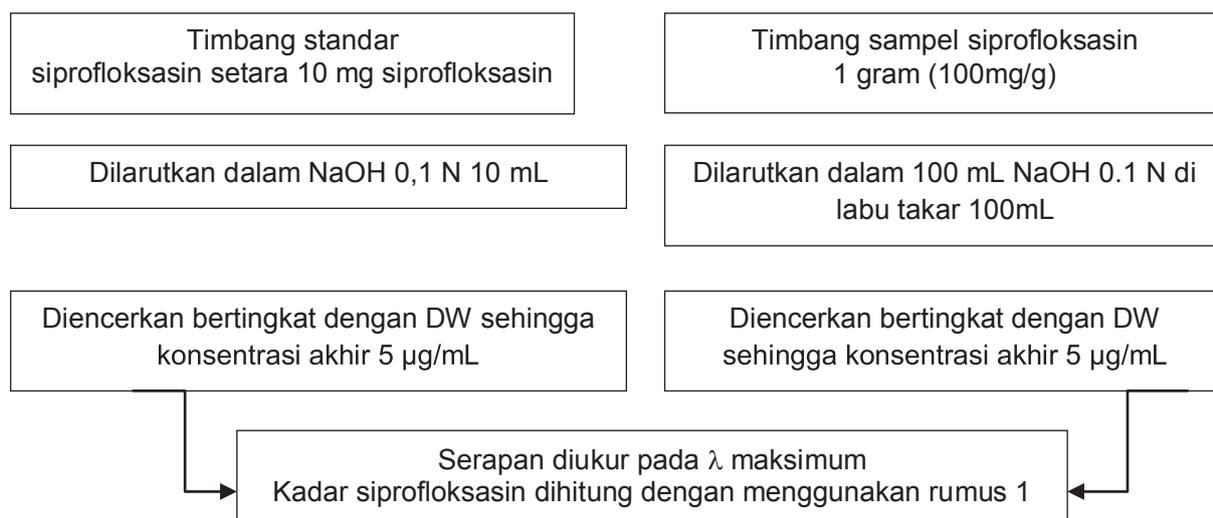
Identifikasi nilai ketidakpastian dilakukan melalui beberapa tahapan. Tahapan tersebut meliputi:

a. Model alur pengujian siprofloksasin

Proses penentuan estimasi nilai ketidakpastian uji kadar siprofloksasin diawali dengan pembuatan model alur pengujian. Adapun model pengujian siprofloksasin terdapat sebagaimana Gambar 1.

b. Diagram *cause effect/fish bone*

Dalam membuat diagram *cause effect/fish bone* harus dilakukan identifikasi sumber-sumber ketidakpastian selama proses uji kadar siprofloksasin berdasarkan metode dan rumus yang digunakan untuk menguji kadar siprofloksasin. Sumber-sumber tersebut antara lain preparasi sampel, kalibrasi alat, kemurnian standar yang digunakan, dan absorbansi standar maupun sampel. Sumber-sumber ketidakpastian dari pengujian siprofloksasin dapat kemudian dijabarkan dalam diagram *cause effect/fish bone*.



Gambar 1 Model Alur Pengujian Siprofloksasin dengan Spektrofotometer UV-Vis

c. Estimasi tiap komponen ketidakpastian perhitungan

Dalam melakukan estimasi tiap ketidakpastian perhitungan, laboratorium harus mampu melakukan kategori tipe tiap komponen ketidakpastian yang mempengaruhi hasil uji. Secara garis besar kategori komponen ketidakpastian dibedakan menjadi dua tipe, yaitu tipe A dan tipe B ^(2,3,5).

Evaluasi ketidakpastian tipe A menggunakan perhitungan statistik ⁽²⁾. Evaluasi tipe ini pengulangan pengukuran dilakukan, maka nilai rerata, simpangan baku eksperimen dari rerata dapat dihitung ⁽³⁾. Dalam pengujian kadar siprofloksasin serbuk yang termasuk komponen ketidakpastian tipe A antara lain presisi pengukuran nilai serapan standar, nilai serapan sampel, presisi penimbangan standar, presisi penimbangan sampel, dan linearitas. Ketidakpastian tipe A (*u*) dari besaran yang ditentukan dari *n* pengamatan berulang yang saling bebas, sehingga didapatkan nilai rata-rata dan standar deviasi ^(2,3,6). Adapun perhitungan ketidakpastian tipe A menggunakan rumus sebagai berikut:

$$u = \frac{s}{\sqrt{n}} \text{ (rumus 2)}$$

Keterangan: *u* = ketidakpastian

s = standar deviasi

n = jumlah pengulangan

Evaluasi ketidakpastian tipe B menggunakan informasi-informasi lain yang valid ⁽²⁾. Misalnya sertifikat standar, sertifikat kalibrasi, spesifikasi peralatan, data validasi metode ^(2,3). Cara perhitungan evaluasi tipe B ketidakpastian diberikan dalam batas tertentu (*a*). Sebagai contoh, jika informasi yang didapatkan berasal dari hasil laporan sertifikat kalibrasi, maka ketidakpastian diperluas dibagi dengan faktor cakupan dalam sertifikat tersebut. Faktor cakupan 2 dapat digunakan jika ketidakpastian diperluas mempunyai tingkat kepercayaan 95%, sehingga rumus nilai ketidakpastian baku adalah sebagai berikut:

$$u = \frac{a}{2} \text{ (rumus 3)}$$

Apabila ketidakpastian tipe B merupakan distributor triangular, maka nilai *a* dibagi dibagi dengan $\sqrt{3}$. Distributor triangular digunakan bila batas dapat ditentukan. Namun nilai besaran ukur tampak berada di semua tempat dalam rentang tersebut ⁽³⁾. Rumus perhitungannya sebagai berikut:

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \text{ (rumus 4)}$$

d. Menghitung ketidakpastian gabungan dan ketidakpastian diperluas

Langkah selanjutnya dalam perhitungan estimasi ketidakpastian pengukuran adalah menggabungkan komponen ketidakpastian baku untuk menghasilkan ketidakpastian baku gabungan. Penggabungan ini disesuaikan dengan persamaan atau rumus yang digunakan dalam perhitungan hasil pengujian, maka persamaan umum untuk menggabungkan nilai ketidakpastian baku dari komponen-komponennya menjadi ketidakpastian gabungan (μ Gabungan) sebagai berikut:

$$\mu \text{ Gabungan} = \sqrt{(\mu_a/a)^2 + (\mu_b/b)^2 + (\mu_c/c)^2 + \dots}$$

Guna mendapatkan probabilitas yang memadai bahwa nilai hasil pengujian berada dalam rentang yang diberikan oleh ketidakpastian, maka ketidakpastian baku gabungan dikalikan dengan faktor cakupan (*coverage factor*). Berdasarkan distribusi Gaussian menunjukkan bahwa faktor cakupan (k) = 2 memberikan ketidakpastian diperluas dengan tingkat kepercayaan sekitar 95%^(1, 2, 3).

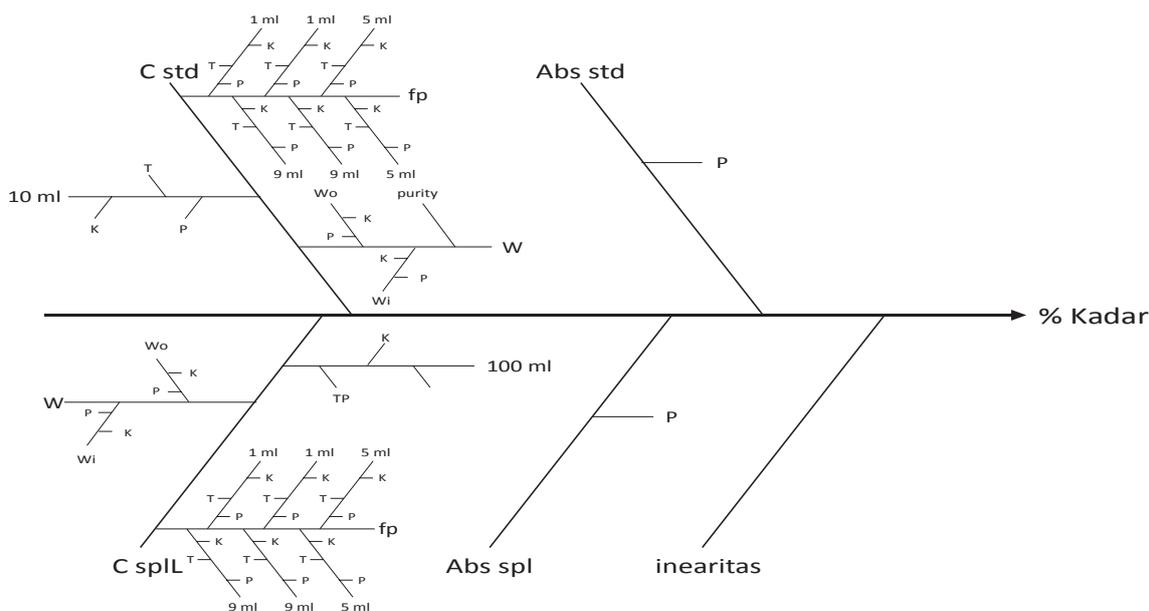
HASIL DAN PEMBAHASAN

Estimasi nilai ketidakpastian dalam uji kadar siprofloksasin dipengaruhi oleh berbagai faktor. Faktor-faktor tersebut antara lain serapan standar siprofloksasin, serapan sampel siprofloksasin, konsentrasi standar siprofloksasin, konsentrasi sampel siprofloksasin, dan linearitas. Faktor-faktor tersebut kemudian dilihat kembali dalam rumus perhitungan kadar siprofloksasin (rumus 1). Komponen-komponen yang terlibat dalam rumus tersebut diidentifikasi dan dijabarkan dalam diagram *cause effect/fish bone* Gambar 2 sebagai berikut:

Setiap faktor yang berpengaruh pada ketidakpastian akan memberikan kontribusi kesalahan terhadap hasil akhir. Adapun rincian estimasi nilai ketidakpastian dari tiap faktor dalam penentuan kadar siprofloksasin sebagai berikut:

1. Serapan standar siprofloksasin

Dalam menentukan ketidakpastian serapan standar siprofloksasin dilakukan percobaan kecil dengan melakukan pengulangan atau presisi pengukuran serapan standar sebanyak 6 kali dengan hasil terdapat dalam Tabel 1.



Gambar 2 Diagram *cause effect/fish bone* uji kadar siprofloksasin serbuk

Tabel 1 Ketidakpastian pengukuran faktor serapan standar siprofloksasin (μ_{Absstd})

Pengulangan ke:	λ maksimal	Serapan
1	271,80	0,544
2	271,70	0,544
3	271,90	0,544
4	272,10	0,543
5	271,90	0,543
6	271,90	0,543
Rata-Rata		0,544
SD (standar deviasi)		0,0006
μ_{Absstd}		0,0006

2. Serapan sampel

Penentuan ketidakpastian serapan sampel dilakukan dengan cara melakukan percobaan kecil dengan melakukan pengulangan atau presisi pengukuran serapan sampel sebanyak 6 kali dengan hasil terdapat dalam Tabel 2.

3. Konsentrasi standar siprofloksasin

Penentuan ketidakpastian faktor konsentrasi standar berasal dari beberapa komponen yaitu: (a) estimasi ketidakpastian asal volume pipet 10 mL, (b) estimasi ketidakpastian asal penimbangan standar, dan (c) estimasi ketidakpastian asal faktor pengenceran. Dari hasil perhitungan tiap komponen faktor didapatkan estimasi ketidakpastian untuk konsentrasi standar adalah 0,07105. Perhitungan estimasi ketidakpastian tiap komponen faktor yang berpengaruh dalam konsentrasi standar tersaji dalam Tabel 3 sebagai berikut:

4. Konsentrasi sampel siprofloksasin

Penentuan ketidakpastian konsentrasi sampel siprofloksasin berasal dari beberapa komponen yaitu: (a) estimasi ketidakpastian asal volume labu takar 100 mL, (b) estimasi ketidakpastian asal penimbangan sampel, dan (c) estimasi ketidakpastian asal faktor pengenceran. Dari hasil perhitungan tiap komponen

faktor didapatkan estimasi ketidakpastian untuk konsentrasi sampel adalah 0,06851. Perhitungan estimasi ketidakpastian tiap faktor komponen yang berpengaruh dalam konsentrasi sampel tersaji dalam Tabel 4.

5. Linearitas

Guna menentukan ketidakpastian baku linearitas dilakukan percobaan kecil dengan membandingkan konsentrasi standar yang diketahui dengan konsentrasi standar yang terbaca oleh spektrofotometer UV-Vis. Perbedaan dari konsentrasi standar yang diketahui dengan konsentrasi hasil analisis spektrofotometer kemudian cari nilai deviasi maksimum dari selisih perbedaan konsentrasi tersebut. Hasil dari percobaan faktor linearitas terdapat dalam Tabel 5.

Estimasi nilai ketidakpastian penentuan kadar siprofloksasin kemudian dihitung dengan cara menggabungkan faktor-faktor yang menjadi sumber ketidakpastian dalam pengujian sampel obat hewan ($\mu_{(x)}/x$). Data pengujian sampel obat hewan siprofloksasin didapatkan serapan untuk standar dengan konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ adalah 0,527 dan serapan untuk sampel dengan konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ adalah 0,529. Perhitungan $\mu_{(x)}/x$ terdapat dalam Tabel 6.

Tabel 2 Ketidakpastian pengukuran faktor serapan sampel siprofloksasin (μ_{Abspl})

Pengulangan ke:	λ maksimal	Serapan
1	272,00	0,541
2	272,10	0,545
3	272,00	0,545
4	272,00	0,541
5	272,00	0,547
6	271,90	0,545
Rata-Rata		0,544
SD (standar deviasi)		0,0025
μ_{Abspl}		0,0025

Tabel 3 Ketidakpastian pengukuran faktor konsentrasi standar siprofloksasin ($\mu_{Cstd}/Cstd$)

Sumber Ketidakpastian	Nilai Ketidakpastian (μ)
Estimasi ketidakpastian asal volume pipet ukur 10mL	
• Asal kalibrasi	0,017321
• Asal presisi	0,0138
• Asal temperatur (efek muai)	0,0048
Ketidakpastian baku gabungan asal volume pipet ukur 10 mL	0,002266
Estimasi ketidakpastian asal penimbangan standar	
• Kemurnian standar	0,0052
• Kalibrasi neraca	0,1276
• Presisi neraca	0,000194
Ketidakpastian baku gabungan asal penimbangan standar	0,018722
Estimasi ketidakpastian asal faktor pengenceran	
• Ketidakpastian asal volume pipet ukur 1 mL	0,004455
• Ketidakpastian asal volume pipet ukur 9 mL	0,01689
• Ketidakpastian asal volume pipet ukur 5 mL	0,01455
Ketidakpastian baku gabungan asal faktor pengenceran	0,0685
Ketidakpastian total dari konsentrasi standar ($\mu_{Cstd}/Cstd$)	0,07105

Tabel 4 Ketidakpastian pengukuran faktor konsentrasi sampel siprofloksasin

Sumber Ketidakpastian	Nilai Ketidakpastian (μ)
a. Estimasi ketidakpastian asal volume labu ukur 100 mL	
• Asal kalibrasi	0,0577
• Asal presisi	0,020084
• Asal temperatur (efek muai)	0,048496
Ketidakpastian baku gabungan asal volume ukur takar 100 mL	0,000780
b. Estimasi ketidakpastian asal penimbangan sampel	
• Kalibrasi neraca	0,00051
• Presisi neraca	0,000753
Ketidakpastian baku gabungan asal penimbangan standar	0,001043
c. Estimasi ketidakpastian asal faktor pengenceran	
• Ketidakpastian asal volume pipet ukur 1 mL	0,004455
• Ketidakpastian asal volume pipet ukur 9 mL	0,01689
• Ketidakpastian asal volume pipet ukur 5 mL	0,01455
Ketidakpastian baku gabungan asal faktor pengenceran	0,0685
Ketidakpastian total dari konsentrasi sampel ($\mu_{Cspl}/Cspl$)	0,06851

Tabel 5 Ketidakpastian asal linearitas

Sampel	Konsentrasi sampel	Konsentrasi terbaca	ΔC
Standar siprofloksasin 1	1,25	1,27	0,02
Standar siprofloksasin 2	2,5	2,49	0,01
Standar siprofloksasin 3	5	4,98	0,02
Standar siprofloksasin 4	10	10,01	0,01
Standar siprofloksasin 5	20	19,19	0,01

Ketidakpastian asal linearitas ($\mu_{linearitas}$) = $0,02/\sqrt{3} = 0,012$

Tabel 6 Data ketidakpastian faktor ketidakpastian uji kadar siprofloksasin terhadap hasil uji kadar sampel siprofloksasin ($\mu(x)/x$)

Asal	$\mu(x)$	satuan	Nilai X	Satuan	$\mu(x)/x$
Serapan standar	0,0006	Abs	0,527	Abs	0,000114
Serapan sampel	0,0025	Abs	0,529	Abs	0,000473
Konsentrasi standar	0,07105	ppm	5	Ppm	0,014210
Konsentrasi sampel	0,06851	ppm	5	Ppm	0,013702
Linearitas	0,014	ppm	-	Ppm	0,012

Selanjutnya dilakukan penggabungan estimasi ketidakpastian faktor-faktor yang mempengaruhi ketidakpastian kadar siprofloksasin dengan rumus menggunakan rumus 4, sebagai berikut: Hasil tersebut kemudian dikalikan faktor (k) kecukupan 2 (tingkat kepercayaan 95%) untuk mendapatkan kemungkinan bahwa hasil yang didapat dalam penentuan kadar siprofloksasin dengan menggunakan spektrofotometer berada dalam rentang yang diberikan oleh ketidakpastian. Didapatkan ketidakpastian pengukuran diperluas adalah sebagai berikut:

$$\mu_{\% \text{ kadar}} = 2 \times 0,023$$

$$\mu_{\% \text{ kadar}} = 0,046\%$$

(dilakukan pembulatan dengan 2 digit penting dibelakang koma)

Adapun cara penulisan estimasi ketidakpastian adalah sebagai berikut, jika hasil uji kadar siprofloksasin dalam sampel

obat hewan serbuk diperoleh 100,38%, maka ketidakpastian menjadi: $(0,046\% \times 100,38\%) / 100\% = 0,05\%$. Nilai 0,05% merupakan rentang nilai yang dinyatakan perkiraan nilai pengujian berada, sehingga kadar siprofloksasin dalam sampel obat hewan nilainya terletak diantara $(100,38 \pm 0,05)\%$.

Ketidakpastian dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya tatacara sampling dan preparasi sampel, kalibrasi peralatan, instrumen, kesalahan random, kesalahan sistemik serta kecakapan personil analisis. Dari hasil perhitungan estimasi nilai ketidakpastian kadar siprofloksasin diperoleh nilai yang relatif kecil. Hal ini menunjukkan, rentang kisaran yang didalamnya terletak nilai benar dari sifat yang diukur relatif kecil sehingga ada kedekatan antara nilai hasil uji dengan nilai yang sebenarnya.

$$\mu_{\% \text{ kadar}} / \% \text{ kadar} = \sqrt{(\mu_{Absstd} / Absstd)^2 + (\mu_{Absspi} / Absspi)^2 + (\mu_{Cstd} / Cstd)^2 + (\mu_{Cspi} / Cspi)^2 + (\mu_{linearitas})^2}$$

$$\mu_{\% \text{ kadar}} / \% \text{ kadar} = 0,023\%$$

KESIMPULAN

Estimasi ketidakpastian untuk uji kadar siprofloksasin dengan menggunakan metode IKP FAR.719 dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh relatif kecil yaitu sebesar 0,046%. Pengujian metode ini menunjukkan kedekatan terhadap nilai benar dari sifat yang diukur.

DAFTAR PUSTAKA

1. Birch K. 2003. Measurement Good Practice Guide No. 36 Estimating Uncertainties in Testing An Intermediate Guide to Estimating and Reporting Uncertainty of Measurement in Testing. British Measurement and Testing Association. Addison-Wesley Publishing Company, Inc, London.
2. Bell S. 2001. Measurement Good Practice Guide No. 11 (Issue 2): A Beginner's Guide to Uncertainty of Measurement.
3. Hadi A. 2018. Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Penguji dan Laboratorium Kalibrasi ISO/IEC 17025:2017. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. Halaman 248-265
4. International Standard Organization. 2017. ISO/IEC:17025:2017 General requirements for the competence of the testing and calibration laboratories. ISO copyright office Geneva, Switzerland
5. Kantasubrata J. 2014. Materi Pelatihan Estimasi Ketidakpastian Pengukuran Laboratorium Kimia. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta
6. LMEB. 2008. Estimation of Uncertainty of Neasurement ORA Laboratory Procedure, Food and Drug Administration. Terdapat dalam www.fda.gov/ora/scince_ref/lm/default.htm. Diunduh pada 25 Maret 2014.
7. Sukirno, Muniasih S, Rosidi. 2012. Estimasi ketidakpastian pada pengukuran AANSC untuk analisis N, P, K, Si, Al, Cu, Fe dalam cuplikan sedimen. Prosiding PPI-PDIPTN. Pustek Akseletor dan Proses Bahan BATAN. ISSN 0216-3128.

KAJIAN TITER ANTIBODI AYAM PETELUR PASCAVAKSINASI AVIAN INFLUENZA (AI) DI DELAPAN PROVINSI DI INDONESIA

Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Rahajeng Setiawaty, Yati Suryati

Unit Uji Virologi

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

Email : ketutkaruni@yahoo.com

ABSTRAK

Penyakit *Avian influenza* (AI) adalah penyakit penting pada unggas, karena bersifat zoonotik dan menyebabkan kerugian ekonomi dengan tingkat morbiditas dan mortalitas penyakit sangat tinggi (90-100%). Salah satu program pengendalian dan pemberantasan penyakit AI adalah dengan vaksinasi. Pengkajian ini dilakukan untuk memperoleh informasi gambaran status kekebalan pascavaksinasi AI pada ayam petelur di 8 (delapan) provinsi di Indonesia yang meliputi Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Bali dan Kalimantan Selatan. Sampel yang diperoleh adalah serum ayam petelur pascavaksinasi AI sebanyak 800 sampel. Terhadap sampel serum ayam petelur pascavaksinasi AI dilakukan uji hambatan hemaglutinasi⁽⁶⁾ untuk mengetahui titer antibodi serum terhadap virus AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2. Apabila lebih dari 70% sampel serum yang berasal dari lokasi pengambilan sampel yang sama menunjukkan titer lebih besar dari 16 (>16) terhadap virus AI subtipe H5N1, berarti vaksin AI yang diaplikasikan protektif terhadap virus AI, khususnya subtipe H5N1⁽²⁾. Sedangkan pengujian sampel serum secara serologis terhadap virus AI subtipe H9N2 menunjukkan hasil positif apabila titer antibodi terhadap virus AI subtipe H9N2 lebih besar dari atau sama dengan 128 (≥ 128)^(4,6). Hasil protektif terhadap virus AI subtipe H5N1 ditunjukkan oleh sampel ayam petelur pascavaksinasi AI yang berasal dari 6 Provinsi yaitu: Sumatera Barat, Jawa Barat, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Bali dan Kalimantan Selatan. Sedangkan sampel serum yang menunjukkan positif terhadap virus AI subtipe H9N2 berasal dari 7 provinsi yaitu: Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan Bali. Dengan memperhatikan bahwa pada saat kegiatan pengkajian ini dilaksanakan belum ada vaksin AI subtipe H9N2 yang telah diregistrasi, maka adanya serum positif virus AI subtipe H9N2 mengindikasikan terjadinya infeksi lapang ataupun penggunaan vaksin AI subtipe H5N1 yang juga mengandung subtipe H9N2.

Kata kunci: *Avian influenza*, vaksin, serologis, hambatan hemaglutinasi

ABSTRACT

Avian influenza (AI) disease is an important disease in poultry, because it is zoonotic and causes economic losses with very high morbidity and mortality rates (90-100%). One of the AI disease control and eradication programs is vaccination. This study was carried out to obtain information on the description of the post-vaccination status of AI in laying hens in 8 (eight) provinces in Indonesia, including West Sumatra, South Sumatra, West Java, Central Java, Yogyakarta, East Java, Bali and South Kalimantan. The samples obtained were 800 samples of post-vaccination serum for laying hens. A hemagglutination inhibition test was carried out on serum samples of post-vaccination AI laying hens (6) to determine serum antibody titer against AI virus subtype H5N1 and subtype H9N2. If more than 70% of the serum samples originating from the same sampling location showed titer greater than 16 (> 16) against the AI virus subtype H5N1, it means that the AI vaccine applied was protective against the AI virus, especially subtype H5N1 (2). While serological testing of serum samples against AI virus subtype H9N2 showed positive results if the antibody titer against AI virus subtype H9N2 was greater than or equal to 128 (≥ 128) (4,6). The protective results against AI virus subtype H5N1 were shown by samples of post-vaccinated AI laying hens from 6 provinces, namely: West Sumatra, West Java, Yogyakarta, East Java, Bali and South Kalimantan. Meanwhile, serum samples that showed positive for the AI virus subtype H9N2 came from 7 provinces: West Sumatra, South Sumatra, West Java, Central Java, Yogyakarta, East Java and Bali. Considering that at the time of this study activity there was no registered AI vaccine for subtype H9N2, so the presence of a positive serum for AI virus subtype H9N2 indicates a field infection or the use of AI vaccine subtype H5N1 which also contains subtype H9N2.

Keywords: *Avian influenza, vaccine, serology, hemagglutination inhibition*

PENDAHULUAN

Penyakit *Avian influenza* (AI) adalah penyakit penting pada unggas, karena bersifat zoonotik dan menyebabkan kerugian ekonomi dengan tingkat morbiditas dan mortalitas penyakit sangat tinggi (90-100%). Penyakit ini disebabkan oleh virus AI subtipe H5N1 yang mempunyai patogenesitas tinggi^(6,11)

Kebijakan Pemerintah dalam pengendalian dan penanggulangan penyakit AI di Indonesia adalah melalui program vaksinasi. Program vaksinasi dilakukan untuk mengurangi jumlah hewan yang peka terhadap infeksi dan mengurangi *shedding* virus atau virus yang dikeluarkan dari hewan tertular sehingga mengurangi kontaminasi lingkungan (memutus mata rantai penyebaran virus AI). Vaksin AI yang beredar di Indonesia adalah vaksin AI yang menggunakan *seed* lokal dan diproduksi di dalam negeri. Saat ini vaksin AI yang beredar di Indonesia adalah vaksin AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2. Penggunaan dan kebutuhan vaksin AI di Indonesia cukup besar, sementara kasus AI di Indonesia masih terjadi.

Pada akhir tahun 2016 dilaporkan terjadinya kasus penurunan produksi telur pada peternakan ayam petelur (*layer*) di beberapa provinsi di Indonesia dan ditengarai kasus tersebut disebabkan oleh virus AI subtipe H9N2. Kondisi ini menyebabkan beberapa pelaku usaha peternakan ayam melakukan vaksinasi AI dengan vaksin AI bivalen, yaitu kombinasi antara AI subtipe H5N1 dan H9N2.

Tujuan pengkajian adalah untuk melihat gambaran status kekebalan paska vaksinasi AI pada ayam *layer* di lapangan.

MATERI DAN METODE

Materi

1. Materi Sampling

Bahan dan alat yang dibawa untuk sampling pengkajian adalah: *ice box* (kotak pendingin), *ice packs*, termometer, spuit 3 mL, kapas alkohol, tabung 1.8 mL, kotak wadah serum, APD (alat pelindung diri), marker, label dan parafilm.

2. Materi Pengujian

Uji Hambatan Aglutinasi (OIE 2015)

Bahan dan alat uji hambatan aglutinasi yaitu virus (antigen AI subtipe H5N1 dan H9N2 produksi Pusvetma, serum positif AI, serum negatif AI, 800 sampel serum dari hasil sampling, *Phospat Buffer Saline/PBS* (Gibco), *Red Blood Cell* (RBC) 1 %, larutan Alsever, alkohol 70 %, iodine, *microplate 96 well V-bottom* (Nunc), *multi channel* 10-100 μ l, *single channel* 25-100 μ l, tips 10-100 μ l, *pipet aids*, *pipet measure* 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, *Biosafety Cabinet* (BSC) tipe 2a, *shaker*, *chamber*, masker, sarung tangan, *baker plastic* volume 2L (*autoclavable*).

Metode

1. Metode Sampling

Sampel serum ayam *layer* pascavaksinasi AI diambil dari 8 Provinsi di Indonesia yang dipilih berdasarkan pertimbangan anggaran Tugas Pembantuan (TP) pengendalian AI⁽⁵⁾, yaitu Sumatera Barat, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Kalimantan Selatan, Sumatera Selatan dan Bali. Dari setiap provinsi dipilih dua Kabupaten/Kota yang disesuaikan dengan arahan Dinas Peternakan setempat. Setiap Kabupaten/Kota diambil sampel darah ayam *layer* pasca vaksinasi AI sebanyak lima puluh (50). Sampel darah diambil melalui *vena brachialis* dengan menggunakan spuit 3 mL, selanjutnya disimpan pada suhu ruang (27-32°C) sampai serumnya keluar. Serum dimasukkan ke dalam tabung 1.8 mL dan disimpan dalam kotak pendingin dengan suhu 2-8°C, untuk selanjutnya diukur titer antibodinya terhadap virus AI di Laboratorium Unit Uji Virologi BBPMSOH.

2. Metode Pengujian

a. Uji Hambatan Hemaglutinasi (OIE 2015) - Uji Hemaglutinasi (HA)

Masukkan 0,025 mL PBS, pH 7.0-7.4 ke dalam masing-masing lubang pada *microplate*. Masukkan 0,025 mL virus AI ke dalam lubang pertama *microplate*. Kemudian buat pengenceran dua kali 0,025 mL antigen. Masukkan 0,025 mL PBS pada semua lubang

microplate. Masukkan 0,025 mL RBC 1% ke semua lubang *microplate*. Homogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC.

- Uji Back Titration

Masukkan 0,025 mL PBS, pH 7.0–7.4 ke dalam masing-masing lubang pada *microplate*. Masukkan 0,025 mL virus AI 4 HAU ke dalam lubang pertama *microplate*. Kemudian buat pengenceran dua kali 0,025 mL antigen. Masukkan 0,025 mL PBS pada semua lubang *microplate*. Masukkan 0,025 mL RBC 1% ke semua lubang *microplate*. Selanjutnya dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC.

- Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

Masukkan 0,025 mL PBS, pH 7.0–7.4 ke dalam masing-masing lubang pada *microplate*. Masukkan 0,025 mL serum ke dalam lubang pertama *microplate*. Kemudian dibuat pengenceran dua kali 0,025 mL serum. Masukkan 0,025 mL antigen 4 HAU pada semua lubang *microplate* dan inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (25-27°C). Masukkan 0,025 mL RBC 1% ke semua lubang *microplate*. Selanjutnya dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC. Interpretasi hasil berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 28/Permentan/OT.140/5/2008 suatu flock peternakan dinyatakan protektif apabila lebih dari 70% sampel memiliki titer protektif lebih dari 16 (>16).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Sampel serum ayam petelur pascavaksinasi AI telah didapat dari 8 provinsi, masing-masing berjumlah 100 sampel perprovinsi, sehingga

total sampel yang terkoleksi sebanyak 800 sampel. Terhadap sampel serum darah tersebut dilakukan uji hambatan hemaglutinasi⁽⁶⁾ untuk mengetahui titer antibodi serum terhadap virus AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2. Apabila lebih dari 70% sampel serum dari flock menunjukkan titer lebih besar dari 16 (≥ 16) terhadap virus AI subtipe H5N1, berarti vaksin AI yang diaplikasikan protektif terhadap virus AI, khususnya subtipe H5N1⁽²⁾. Sampel serum dinyatakan positif antibodi terhadap virus AI subtipe H5N1 bila memiliki titer sebesar 16, dan dinyatakan negatif bila titer kurang dari 16.

Pengujian sampel serum secara serologis terhadap virus AI subtipe H9N2 dinyatakan positif apabila titer antibodi terhadap virus AI subtipe H9N2 lebih besar dari 128 (≥ 128)^(6,11). Pengujian terhadap ada tidaknya titer antibodi terhadap antigen virus AI subtipe H9N2 dilakukan karena pada saat kegiatan pengkajian ini dilaksanakan vaksin AI yang telah diregistrasi masih terbatas pada vaksin tunggal AI subtipe H5N1.

Hasil uji serologis terhadap 800 sampel serum pascavaksinasi AI sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 dapat dilihat keragaan protektivitas vaksin AI berdasarkan pengujian titer antibodi virus AI Subtipe H5N1 dan H9N2 dalam serum pascavaksinasi AI di 8 Provinsi di Indonesia Tahun 2019 sebagai berikut:

2.1 Secara keseluruhan, vaksinasi AI belum memenuhi kriteria protektif karena sampel serum yang menunjukkan titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16 berjumlah 508 sampel (63.5%), atau kurang dari 70%.

2.2 Secara spesifik per lokasi pengambilan sampel menunjukkan bahwa di beberapa kabupaten/kota pelaksanaan vaksinasi AI memenuhi kriteria protektif terhadap virus AI H5N1 karena lebih dari 70% (>70%) memiliki titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16. Vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan proteksi terhadap virus AI H5N1 yaitu yang dilaksanakan di 8 kabupaten/kota di 5 provinsi, meliputi:

a. Sumatera Barat : Kabupaten Payakumbuh

- dan Kabupaten Lima Puluh Kota
 - b. Jawa Barat : Kabupaten Kuningan.
 - c. DI Yogyakarta : Kabupaten Sleman.
 - e. Bali : Kabupaten Tabanan dan Kabupaten Badung.
 - f. Kalimantan Selatan : Kabupaten Banjar Baru dan Kota Banjar.
- 2.3 Hasil serologis dari serum ayam petelur pascavaksinasi yang menunjukkan bahwa flock peternakannya positif terhadap virus AI subtype H9N2 (memiliki titer antibodi virus AI H9N2 di atas 128) adalah:
- a. Sumatera Barat : Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota.
 - b. Sumatera Selatan: Kabupaten Banyuasin dan Kota Palembang.
 - c. Jawa Barat: Kabupaten Kuningan.
 - d. Jawa Tengah : Kabupaten Demak.
 - e. DI Yogyakarta : Kabupaten Bantul dan Kabupaten Sleman
 - f. Jawa Timur : Kabupaten Blitar dan Kabupaten Kediri.
 - e. Bali : Kabupaten Badung dan Kabupaten Tabanan.

Tabel 1. Hasil Uji Titer Antibodi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 dan H9N2 Serum Paskavaksinasi AI di 8 Provinsi di Indonesia Tahun 2019

No	Provinsi	Titer Antibodi AI H5N1			Titer Antibodi AI H9N2	
		> 16	16	< 16	≥128	< 128
1	Sumatera Barat					
	Payakumbuh	50 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	44 (88%)	6 (12%)
	Lima Puluh Kota	48 (96%)	0 (0%)	2 (4%)	18 (36%)	32 (64%)
2	Sumatera Selatan					
	Banyuasin	20 (40%)	12 (24%)	18 (36%)	36 (72%)	14 (28%)
	Kota Palembang	29 (58%)	12 (24%)	9 (18%)	18 (36%)	32 (64%)
3	Jawa Barat					
	Kuningan	49 (98%)	1 (2%)	0 (0%)	27 (54%)	23 (46%)
	Cirebon	2 (4%)	39 (78%)	9 (18%)	0 (0%)	50 (100%)
4	Jawa Tengah					
	Demak 1	24 (48%)	14 (28%)	12 (24%)	13 (26%)	37 (74%)
	Demak 2	21 (42%)	23 (26%)	6 (12%)	39 (78%)	11 (22%)
5	Daerah Istimewa Yogyakarta					
	Bantul	8 (16%)	20 (40%)	22 (44%)	30 (60%)	20 (40%)
	Sleman	38 (76%)	4 (8%)	8 (16%)	33 (66%)	17 (34%)
6	Jawa Timur					
	Blitar	35 (70%)	7 (14%)	8 (16%)	42 (84%)	8 (16%)
	Kediri	1 (2%)	2 (4%)	47 (94%)	29 (58%)	21 (42%)
7	Bali					
	Tabanan	46 (92%)	4 (8%)	0 (0%)	16 (32%)	34 (68%)
	Badung	47 (94%)	3 (6%)	0 (0%)	2 (4%)	48 (96%)
8	Kalimantan Selatan					
	Banjar Baru	41 (82%)	7 (14%)	2 (4%)	0 (0%)	50 (100%)
	Banjar	49 (98%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	50 (100%)
	Total	508 (63.5 %)	149 (18.62 %)	143 (17.88 %)	347 (43.37 %)	453 (56.63 %)

PEMBAHASAN

Serum pascavaksinasi AI H5N1 berasal dari ayam petelur dengan umur yang bervariasi antara 7-72 minggu berhasil dikoleksi sebanyak 800 sampel. Sampel serum tersebut kemudian diuji dengan uji hambatan aglutinasi untuk mengukur titer antibodi yang timbul terhadap virus AI. Virus yang digunakan adalah AI sub tipe H5N1 dan AI sub tipe H9N2.

Hasil titer antibodi terhadap AI sub tipe H5N1 positif jika mempunyai titer minimal 16 ⁽¹⁾, dan vaksinasi AI dinyatakan protektif terhadap flock bila lebih dari 70% mempunyai titer lebih besar dari 16 ⁽²⁾.

Hasil titer antibodi terhadap AI sub tipe H9N2 positif jika mempunyai titer lebih besar atau sama dengan 128 (≥ 128) ^(4,6)

Tabel 3 menunjukkan bahwa secara keseluruhan 508 sampel (63.5%) dari 800 sampel serum ayam petelur yang diuji memiliki titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16. Hasil ini menunjukkan bahwa vaksinasi AI yang diterapkan belum mampu menimbulkan proteksi. Secara spesifik per lokasi pengambilan sampel menunjukkan bahwa di beberapa kabupaten / kota pelaksanaan vaksinasi AI memenuhi kriteria protektif terhadap virus AI H5N1 karena lebih dari 70% (>70%) memiliki titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16. Vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan proteksi terhadap virus AI H5N1 yaitu yang dilaksanakan di 8 kabupaten/kota di 5 provinsi, meliputi:

Sumatera Barat : Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota
Jawa Barat : Kabupaten Kuningan.
DI Yogyakarta : Kabupaten Sleman.
Bali : Kabupaten Tabanan dan Kabupaten Badung.
Kalimantan Selatan : Kabupaten Banjar Baru dan Kota Banjar.

Keberhasilan program vaksinasi dapat dilihat dari nilai protektif terhadap virus AI sub tipe H5N1 yang didapat. Peternakan yang tidak mempunyai tingkat proteksi dapat

disebabkan berbagai faktor diantaranya tata laksana vaksinasi, tata laksana peternakan, dan biosekuriti lingkungan yang kurang memadai. Tata laksana vaksinasi dan tata laksana peternakan terlihat dari data vaksinasi di peternakan yang tidak terdokumentasi dengan baik, dan tidak adanya riwayat vaksinasi AI di peternakan. Tabel 1 menunjukkan bahwa 347 (43,37%) sampel serum yang diuji terhadap titer antibodi virus AI sub tipe H9N2 menunjukkan hasil positif karena mempunyai titer lebih besar atau sama dengan 128 (≥ 128). Sampel serum tersebut berasal dari 7 provinsi meliputi: Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan Bali.

Sampel serum pascavaksinasi vaksin AI yang menunjukkan titer antibodi protektif virus AI H5N1 (>70% flock mempunyai titer antibodi H5N1 >16) dan positif sub tipe H9N2 (mempunyai titer antibodi H9N2 ≥ 128), diindikasikan terjadinya infeksi lapang atau penggunaan vaksin AI sub tipe H5N1 yang juga mengandung sub tipe H9N2. Sampel serum tersebut berasal dari 6 kabupaten/kota di 4 provinsi, meliputi Provinsi: 1) Sumatera Barat (Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota), 2) Jawa Barat (Kabupaten Kuningan), 3) DIY (Kabupaten Sleman), dan 4) Bali (Kabupaten Badung dan Tabanan).

Dengan mempertimbangkan bahwa pada saat kegiatan pengkajian ini dilaksanakan belum ada vaksin AI kombinasi antara virus AI sub tipe H5N1 dan sub tipe H9N2, atau vaksin AI tunggal sub tipe H9N2 yang telah diregistrasi, maka adanya serum positif virus AI sub tipe H9N2 mengindikasikan ayam-ayam tersebut pernah terpapar virus AI sub tipe H9N2 yang berasal dari infeksi lapang atau penggunaan vaksin AI sub tipe H5N1 yang juga mengandung sub tipe H9N2.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Tingkat keberhasilan program vaksinasi yang dilakukan di tingkat peternakan kurang dari 70% pada sampel serum yang berasal dari Kabupaten Demak (Provinsi Jawa Tengah), Kabupaten Bantul (Provinsi DIY), Kabupaten Banyuasin dan Kota Palembang (Provinsi Sumatera Selatan), Kabupaten Kediri (Provinsi Jawa Timur), dan Kabupaten Cirebon (Provinsi Jawa Barat).

Adanya serum positif virus AI subtipe H9N2 pada sampel yang berasal dari Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota (Provinsi Sumatera Barat), Kabupaten Banyuasin dan Kota Palembang (Provinsi Sumatera Selatan), Kabupaten Kuningan (Provinsi Jawa Barat), Kabupaten Demak (Provinsi Jawa Tengah), Kabupaten Bantul dan Kabupaten Sleman (Provinsi DI Yogyakarta), Kabupaten Blitar dan Kabupaten Kediri (Provinsi Jawa Timur), Kabupaten Badung dan Kabupaten Tabanan (Provinsi Bali), mengindikasikan ayam-ayam tersebut pernah terpapar virus AI subtipe H9N2 yang berasal dari infeksi lapang atau penggunaan vaksin AI subtipe H5N1 yang juga mengandung subtipe H9N2.

Saran

1. Memberi masukan kepada Dinas Peternakan Provinsi Jawa Tengah, Provinsi Daerah Isimewa Yogyakarta, Provinsi Sumatera Selatan, Provinsi Jawa Timur, Provinsi Sumatera Barat, Provinsi Jawa Barat, Provinsi Bali, dan Provinsi Kalimantan Selatan bahwa dapat meningkatkan evaluasi hasil vaksinasi secara rutin ditingkat peternakan dan meningkatkan pelaksanaan biosekuriti pada peternakan tersebut.
2. Perlu dilakukan pengkajian vaksin AI dan serum paska vaksinasi di seluruh provinsi Indonesia yang berkesinambungan, agar data yang diperoleh terkait kualitas mutu vaksin AI yang beredar dapat dievaluasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. [Ditjennak]. 2007. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 3.
2. [Ditjennak]. 2008. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 28/Permentan/OT.140 /5/2008. Tentang Pedoman Penataan Kompartemen dan Penataan Zona Usaha Perunggasan.
3. [Ditjennak]. 2017. Peta Status dan Situasi Penyakit Hewan Nasional.
4. [Ditjennak]. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 5.
5. [Ditjennak]. 2019. Perencanaan Anggaran Kesehatan Hewan 2019 yang disampaikan pada Rakernas tanggal 15 Januari 2019 di Bogor.
6. [OIE] Office International Des Epizooties. 2015. OIE Terrestrial Manual. Avian Influenza. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14._ND.pdf.
7. Alexander DJ. 1996. Highly Pathogenic Avian Influenza. Manual of Standars for Diagnostic Test and Vaccines. OIE. hal. 155-160.
8. Hewajuli, Dharmayanti NLPI. 2008. Karakterisasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza (AI). Wartazoa Vol. 18 No. 2.
9. Lee CW, Saif YM. 2009. Avian Influenza Virus. J. of Comparative Imm., Micr and Infect Dis (32). hal: 301-310.
10. Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, De Jong MD, Vijayakrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rainer JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farra J. Webster RG, Chen H, Peiris JS and Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. Virology 50(2): 258 – 268.
11. Swayne DE, Havorson DA. 2008. Influenza. Editor Saif YM dalam Disease of Poultry. Edisi 12. Blackwell Publishing. Hal: 153-184.
12. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. 56: 152 – 179.

UJI POTENSI VAKSIN AVIAN INFLUENZA

Nur Khusni Hidayanto, Yati Suryati

Unit Uji Virologi

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

Email : khusnihidayanto@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan uji potensi terhadap 4 (empat) vaksin Avian influenza (AI) yang beredar di Indonesia. Pengujian dilakukan sesuai Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid 1 Edisi 5 tahun 2018. Vaksin disuntikkan pada ayam *Specific Pathogen Free* (SPF) umur 4 minggu, kemudian 3 minggu pascavaksinasi diambil darahnya untuk diuji hambatan aglutinasi (HI) dan dilakukan ujiantang menggunakan virus AI *A/chicken/Semarang/04141225-07/2014* (clade 2.3.2). Hasil pengujian menunjukkan bahwa vaksin AI yang diuji menunjukkan titer antibodi yang bervariasi tetapi tetap mampu melindungi dari infeksi virus AI *A/chicken/Semarang/04141225-07/2014*.

Kata kunci: Uji Potensi, Vaksin, Avian Influenza

ABSTRACT

Potency tests have been carried out on 4 (four) Avian influenza (AI) vaccines circulating in Indonesia. The test was carried out according to the Indonesian Veterinary Drug Pharmacopeia (FOHI) Volume 1, Edition 5 of 2018. The vaccine was injected into Specific Pathogen Free (SPF) chickens aged 4 weeks, then 3 weeks after vaccination the blood was collected to be tested for agglutination resistance (HI) and a challenge test using a virus AI A/chicken/ Semarang/04141225-07/2014 (clade 2.3.2). The test results showed that the AI vaccines tested showed varying antibody titres but the vaccines were still able to protect against A/chicken/ Semarang/04141225-07/2014 virus infection.

Keywords: Potency Test, Vaccine, Avian Influenza

PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) disebabkan oleh virus yang merupakan anggota dari keluarga Orthomyxoviridae dan ditempatkan dalam genus virus *influenza A*⁽⁷⁾. *Avian influenza* pertama kali dilaporkan pada tahun 1878 dan dikenal dengan nama *fowl plaque*. Pada simposium *Avian influenza* tahun 1981, nama *fowl plaque* diganti dengan *highly pathogenic avian influenza* (HPAI)⁽⁵⁾.

Avian influenza mempunyai dampak ekonomi yang penting pada industry perunggasan karena menyebabkan mortalitas dan morbiditas yang tinggi, penurunan produksi, dan peningkatan biaya penanggulangan. Di samping itu, virus ini juga bersifat zoonosis sehingga cara penanggulangannya menjadi kompleks dan mahal⁽³⁾. Kerugian ekonomi dari AI bervariasi tergantung pada strain virus, jenis unggas yang terinfeksi, jumlah peternakan yang terinfeksi, metode kontrol yang digunakan dan kecepatan pelaksanaan strategi pengendalian atau eradikasi. Kerugian ekonomi timbul karena kasus epidemi HPAI atau LPAI pada unggas komersil. Secara umum kerugian karena kasus LPAI lebih rendah dibanding HPAI⁽¹¹⁾.

Penentu patogenisitas virus *Influenza* secara molekuler telah diidentifikasi, yaitu sifat dari residu pada *cleavage site* HA, reseptor HA (α -2, 3 atau α -2,6 *sialic acid*), kemampuan NA untuk mengikat plasminogen, perubahan asam amino spesifik dalam PB2 yang mengubah tingkat sintesis RNA, kehadiran PB1-F2 ORF dan kemampuan PB1-F2 untuk menginduksi apoptosis, dan kemampuan yang berbeda dari NS1 protein untuk melawan sistem *interferon* (IFN)⁽⁴⁾. Protein HA dan NA merupakan antigen yang paling penting untuk produksi respon imun protektif, terutama dalam netralisasi antibodi⁽¹¹⁾.

Virus AI masuk ke hospes melalui saluran pernafasan (inhalasi) atau pencernaan (ingesti). Virus akan bereplikasi pada saluran pernafasan dan pencernaan, kemudian menyebar melalui sistem peredaran darah atau sistem limfatik ke berbagai organ viseral, otak dan kulit. Gejala klinis dan kematian muncul karena kerusakan

berbagai organ⁽¹¹⁾.

Wabah *Avian influenza* (AI) di Indonesia telah terjadi sejak pertengahan tahun 2003⁽²⁾. Kasus AI di Indonesia masih terus terjadi dengan frekuensi yang beragam selama tahun 2006-2012. Pada akhir tahun 2012 terjadi kasus AI pada itik di daerah Jawa Tengah, D.I. Yogyakarta dan Jawa Timur yang disebabkan penyakit AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2⁽¹⁴⁾.

Penyebaran virus AI H5N1 pada unggas di Asia, Timur Tengah dan Afrika telah memicu kekhawatiran pandemi manusia dan mendorong upaya pengembangan vaksin AI H5N1⁽¹⁰⁾. Efikasi vaksin AI H5N1 komersial yang beredar di Indonesia berubah ketika virus AI subtipe H5N1 di Indonesia berevolusi menjadi *clades* baru, sehingga harus dijamin kesesuaian *seed* vaksin dan virus AI H5N1 di lapangan⁽¹³⁾. Pembaharuan *hemagglutinin* virus AI H5N1 yang lebih dekat secara genetik dengan virus di lapangan mungkin diperlukan untuk perlindungan optimal⁽⁶⁾.

Uji deteksi antibodi banyak digunakan untuk mengevaluasi paparan virus AI pada unggas. Uji deteksi antibodi saat ini meliputi uji ELISA, uji *agar Gel Immuno Diffusion*, dan uji hambatan hemagglutinasasi (HI)⁽⁸⁾. Metode serologis HI atau NI merupakan metode *gold standard* untuk mengetahui subtipe virus meskipun dimungkinkan adanya kesalahan karena variasi antigenik dalam subtipe atau reaksi silang antar subtipe⁽⁸⁾. Metode serologis juga perlu dipertimbangkan variasi respon kekebalan antar spesies unggas⁽¹¹⁾. Metode yang digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik pada unggas yaitu uji *Agar Gel Immunodifusion* (AGID) dan uji *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA)⁽⁹⁾.

Penelitian ini untuk mengetahui hubungan titer antibodi pascavaksinasi dan hasil uji tantang pada uji potensi vaksin AI.

MATERI DAN METODE

Materi

Pada penelitian ini digunakan 4 (empat) vaksin inaktif *Avian influenza* subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang diproduksi oleh 4 (empat)

produsen yang berbeda dan ayam SPF umur 4 minggu. Virusantang yang digunakan yaitu virus AI *A/chicken/Semarang/04141225-07/2014*, sedangkan antigen AI yang dipakai yaitu antigen AI H5 clade 2.3.2 produksi Pusvetma. Uji *shedding virus* menggunakan telur SPF umur 10 hari.

Metode

Uji potensi dilakukan sesuai metode uji potensi AI FOHI Biologik Jilid I Edisi 5 Tahun 2018. Sepuluh ekor ayam SPF umur 28 hari divaksinasi masing-masing 1 dosis secara *intra muscular* (IM). Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Tiga minggu pascavaksinasi atau sebelum uji tantang dilakukan pengambilan serum untuk dilakukan uji hambatan aglutinasi (HI) menggunakan metode OIE⁽⁷⁾. Semua ayam ditantang dengan virus AI *A/chicken/Semarang/04141225-07/2014* masing-masing 0.1 mL 10^{6.0} EID₅₀ secara IM. Pengujian dilakukan di fasilitas *Biosafety Level 3* (BSL-3) / *Animal Biosafety Level 4* (ABSL-4) di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 90% ayam kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis penyakit AI dan tidak kurang 90% ayam kelompok kontrol mati dengan menunjukkan gejala klinis penyakit AI serta tidak terjadi *shedding virus* setelah hari ke-7 pascatantang virus AI.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian vaksin *Avian influenza* di BBPMSOH menggunakan metode sesuai FOHI 2018. Ayam SPF divaksin 1 dosis secara intramuskular. Tiga minggu pasca vaksinasi ayam diambil darahnya dan ditantang dengan virus AI *A/chicken/Semarang/04141225-07/2014*. Pada hari kedelapan pasca tantang ayam diambil *swab* dari *oropharynx* dan *cloaca*. Penggunaan virus AI *A/chicken/Semarang/04141225-07/2014* sebagai virus tantang sesuai surat Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan No.

22017/PK.350/F/06/2018 tentang Perubahan StrainTantang Vaksin AI H5N1 dan Penetapan Master Seed Vaksin AI H9N2.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa vaksin AI mempunyai titer antibodi pratantang yang bervariasi dari 4–44 tetapi mampu melindungi dari infeksi virus AI *A/chicken/Semarang/04141225-07/2014* (Table 1). Hal ini sesuai dengan penelitian⁽¹⁾ yang menyatakan bahwa meskipun respon antibodi terhadap H5 rendah, unggas yang divaksinasi tetap terlindungi dari tantangan HPAI. Menurut⁽¹¹⁾ kekebalan yang protektif dikaitkan dengan antibody terhadap protein HA, tetapi antibodi terhadap terhadap HA, NA atau keduanya mencegah gejala klinis dan kematian setelah ditantang dengan virus HPAI dengan subtype HA atau NA yang homolog.

Respon imun humoral pada unggas pada infeksi alami kemungkinan besar memproduksi antibodi sistemik dan mukosa. Respon antibodi sistemik pada ayam dan kalkun mirip dengan spesies lain dengan produksi IgM yang terbentuk paling cepat 5 hari pasca infeksi dan IgY terdeteksi segera setelahnya. Antibodi yang diproduksi hospes ditargetkan terhadap berbagai protein virus influenza yang penting untuk perlindungan dari penyakit dan untuk diagnosis infeksi. Virus influenza menghasilkan 10 protein virus yang dapat dibagi menjadi tiga kategori utama: protein permukaan, protein internal, dan protein non struktural yang tidak dikemas dalam partikel virus. Partikel virus mengandung tiga protein permukaan: protein HA, neuraminidase (NA), dan matriks 2 (M2). Protein internal meliputi tiga protein polimerase, PA, PB1, dan PB2, nukleoprotein, matriks 1 (M1), dan protein nonstruktural 2 (NS2). Protein nonstruktural 1 (NS1) adalah satu-satunya protein yang tidak dikemas ke dalam partikel virus, meskipun di produksi dalam jumlah besar dalam sel yang terinfeksi⁽⁹⁾.

Tabel 1. Hasil uji potensi vaksin *Avian influenza*

No	Kode Vaksin	Jenis Vaksin	Hasil Uji		
			Rata-Rata Titer Antibodi Pre Tantang (log 2)	Uji Potensi Terhadap AI	Uji <i>Shedding</i> Virus
1	A	AI H5 + H9	8	100%	100% Negatif
2	B	AI H5 + ND	4	100%	100% Negatif
3	C	AI H5 + ND	44	100%	100% Negatif
4	D	AI H5 + ND	18,4	100%	100% Negatif

KESIMPULAN

Hasil uji terhadap 4 (empat) vaksin AI subtype H5N1 *clade* 2.3.2 menunjukkan bahwa protektivitas suatu vaksin tidak hanya ditentukan oleh satu antibodi terhadap H5 yang terbentuk. Pengujian uji potensi vaksin AI *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) harus menggunakan metode tantang terhadap virus AI.

DAFTAR PUSTAKA

- Chua T., Leung C. Y. H., Fang H. E., Chow C., Ma S., Sia S., Ng I. H. Y., Fenwick G. S., James C. M., Chua S. B., Chew S. T. and Kwang J. 2010. Evaluation of a Subunit H5 Vaccine and an Inactivated H5N2 Avian Influenza Marker Vaccine in Ducks Challenged with Vietnamese H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Influenza Research and Treatment*. Article ID 489213. doi:10.1155/2010/489213
- Damayanti R., Dharmayanti N.L.P.I., Indriani R., Wiyono A. dan Darminto. 2004. Deteksi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Organ Ayam yang Terserang Flu Burung Sangat Patogenik di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan Teknik Imunohistokimia. *JITV*9(3):197-203
- Dharmayanti N.L.P.I., Diwyanto K. dan Bahri S. 2012. Mewaspada Perkembangan Avian Influenza (AI) dan Keragaman Genetik Virus AI/H5N1 di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 5(2):124-141.
- Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R. and Lamb R.A. 2008. A New Influenza Virus Virulence Determinant: The NS1 Protein Four C-Terminal Residues Modulate Pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(11):4381-4386.
- Johnson D.C. 1981. Avian Influenza. *A.A.V. Newsletter*. 2(2): 3
- Kapczynski D.R., Pantin-Jackwood M.J., Spackman E., Chrzastek K., Suarez D.L. and Swayne D.E. 2017. Homologous and heterologous antigenic matched vaccines containing different H5 hemagglutinins provide variable protection of chickens from the 2014 U.S. H5N8 and H5N2 *clade* 2.3.4.4 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *Vaccines* 35:6345-6353.
- OIE. 2012. Avian Influenza. *OIE Terrestrial Manual*. Chapter 2.3.4.
- Spackman E. 2007. Avian Influenza Virus. Humana Press.
- Suarez D.L. and Schultz-Cherry S. 2000. Immunology of Avian influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology*. 24:269-283.
- Steel J. 2011. New strategies for the development of H5N1 subtype influenza vaccines: progress and challenges. *Bio Drugs*, 25(5):285-298.
- Swayne D.E. and Halvorson D.A. 2008. Influenza. *Disease of Poultry* 12th Edition. Blackwell Publishing. 153-183.

12. Tian G., Zhang S., Li Y., Bu Z., Liu P., Li C., Shi J., Yu K. dan Chen H. 2005. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology* 341:153-162.
13. Villanueva-Cabezas J.P., Coppo M.J.C., Durr P.A. and McVernon J. 2017. Vaccine efficacy against Indonesian Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1: systematic review and meta-analysis. *Vaccines*, Volume 35:4859-4869.
14. Wibawa H., Prijono W.B., Dharmayanti N.L.P.I., Irianingsih S.H., Miswati Y., Rohmah A., Andesya E., Romlah, Daulay R.S.D., dan Safitri K. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta dan Jawa Timur : Identifikasi sebuah clade baru virus Avian Influenza subtype H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner BBVet Wates*. 12(4):2-9.

PENGAJIAN MUTU VAKSIN AVIAN INFLUENZA (AI) SUB TIPE H5N1 DI TUJUH PROVINSI DI INDONESIA TAHUN 2019

Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Dina Kartini, Dewi Astuti

Unit Uji Virologi
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340
Email : ketutkaruni@yahoo.com

ABSTRAK

Salah satu program pengendalian dan pemberantasan penyakit *Avian Influenza (AI)* adalah dengan vaksinasi. Pengkajian mutu vaksin AI ini dilakukan untuk memperoleh informasi tentang mutu vaksin AI yang telah memiliki nomor registrasi di Indonesia, memperoleh data kemurnian dan potensi vaksin AI di tujuh (7) provinsi di Indonesia yang meliputi Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, dan Kalimantan Selatan. Sampel yang diperoleh adalah vaksin AI subtipe H5N1 inaktif sebanyak 7 (tujuh) sampel. Terhadap sampel vaksin dilakukan uji mutu vaksin meliputi rangkaian uji identifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* konvensional, uji inaktivasi dan uji potensi secara serologi. Pengujian mutu vaksin AI H5N1 inaktif menunjukkan hasil memenuhi syarat (MS) untuk sampel yang diambil dari 5 (lima) provinsi yaitu: Sumatera Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan Kalimantan Selatan. Sedangkan sampel vaksin yang berasal dari Sumatera Selatan dan Jawa Barat menunjukkan hasil tidak memenuhi syarat (TMS).

Kata kunci: Avian Influenza, vaksin, pengkajian

ABSTRACT

One of the programs for controlling and eradicating Avian Influenza (AI) is vaccination. This AI vaccine quality test was carried out to obtain information about the quality of AI vaccines that already have a registration number in Indonesia, to obtain data on the purity and potential of AI vaccines in seven (7) provinces in Indonesia which include West Sumatra, South Sumatra, West Java, Central Java, Special Region of Yogyakarta, East Java and South Kalimantan. The sample obtained was 7 (seven) inactivated AI vaccine subtype H5N1. Vaccine samples were tested for the quality of vaccines including a series of identification tests with the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) method, inactivation tests and serological potency tests. Testing the quality of the inactivated H5N1 AI vaccine showed the results meet the requirements (MS) for samples taken from 5 (five) provinces, namely: West Sumatra, Central Java, Yogyakarta, East Java and South Kalimantan. Meanwhile, the vaccine samples from South Sumatra and West Java showed the results did not meet the requirements (TMS).

Keywords: Avian Influenza, vaccine, study

PENDAHULUAN

Virus Influenza adalah virus RNA berantai tunggal termasuk ke dalam keluarga *Orthomyxoviridae*. Berdasarkan perbedaan antigen nukleoprotein dan matrik yang menyusunnya, virus ini diklasifikasikan menjadi tiga tipe yaitu virus Influenza tipe A, B dan C. Virus Influenza tipe A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda dan kadang-kadang pada mamalia lain, misalnya cerpelai, anjing laut dan ikan paus. Virus Influenza tipe B dan C hanya ditemukan pada manusia ^(4,5).

Virus AI diklasifikasikan dalam dua patotipe yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Virus AI yang mempunyai patogenesis tinggi apabila mempunyai *Indeks Patogenicity Intravena* (IVPI) pada ayam umur 6 minggu lebih dari 1.2 atau menyebabkan minimal 75% kematian pada ayam umur 4-8 minggu yang diinfeksi secara intravena, sedangkan virus AI yang mempunyai patogenesis rendah adalah semua virus Influenza A subtype H5 dan H7 yang bukan virus HPAI ⁽¹⁾.

Kejadian penyakit AI subtype 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 keseluruh negara ⁽⁴⁾.

Wabah penyakit AI di Indonesia pertama kali pada tahun 2003. Saat ini penyakit AI masih menjadi penyakit hewan menular strategis (PHMS) dalam Keputusan Menteri Pertanian Nomor 4026/Kpts/OT.140/3/2013 ⁽²⁾. Pada tahun 2013 juga terjadi wabah penyakit AI yang terjadi di Indonesia disebabkan virus AI subtype H5N1 sub clade 2.3.2, sehingga selain vaksin AI subtype H5N1 sub clade 2.1.3 juga beredar vaksin AI subtype H5N1 dengan sub clade 2.3.2. Pada akhir tahun 2016 dilaporkan

terjadinya kasus penurunan produksi telur pada peternakan ayam petelur (layer) di beberapa provinsi di Indonesia dan ditengarai kasus tersebut disebabkan oleh virus AI subtype H9N2. Kondisi ini menyebabkan beberapa pelaku usaha peternakan ayam melakukan vaksinasi AI dengan vaksin AI bivalen, yaitu kombinasi antara AI subtype H5N1 dan H9N2.

Pada tahun 2019 saat dilakukan pengkajian ini, vaksin AI yang beredar di Indonesia adalah vaksin AI subtype H5N1 inaktif produksi lokal dengan *seed* vaksin dari strain lokal. Penggunaan dan kebutuhan vaksin AI di Indonesia cukup besar, sementara kasus AI di sebagian wilayah Indonesia masih terjadi, sehingga diperlukan data pengkajian mutu vaksin AI yang beredar di lapangan berdasarkan hasil uji identifikasi terhadap virus AI subtype H5N1 dan H9N2, inaktivasi dan potensi, serta status kekebalan pasca vaksinasi AI pada ayam layer di lapangan. Pengkajian ini dilakukan untuk memperoleh data mutu vaksin AI yang resmi beredar di Indonesia dan memperoleh data kemurnian dan potensi vaksin AI.

MATERI DAN METODE

Materi

1. Materi Sampling

Bahan dan alat yang dibawa untuk sampling pengkajian mutu vaksin AI adalah: *ice box* (kotak pendingin), *ice packs*, termometer dan kuisioner.

2. Materi Pengujian

a. Uji Identifikasi

Bahan dan alat dari uji identifikasi yaitu vaksin AI inaktif 1 botol, Kit ekstraksi RNA (Qiam Viral RNA mini kit), Kit master Mix PCR, primer spesifik AI H5N1 dan H9N2 dan alat PCR konvensional. Sekuen primer H5 (*forward* 5'-ACACATGCYCARGACATACT-3', *reverse* 5'-CTYTGRTTYAGTGTTGATGT-3'), sekuen primer N1 (*forward* 5'-AGRCCTTGYYTCTGGGTTGA-3', *reverse* 5'-ACC GTCTGGC CAAGACCA-3'). Sekuen primer H9 (*forward*

5'-GACACAACAACGAGTGTGGC-3',
reverse 5'-GCCCATATATCTTGGATTTGAT
-3'), sekuen primer N2 (forward 5'-
GCATGGTCCAGYTCAAGY TG -3', reverse 5'-
CCYTTC CAGTTGTCTCTGCA -3').

b. Uji Inaktivasi

Bahan dan alat uji inaktivasi yaitu telur ayam berembrio (TAB) *Spesific Pathogen Free* (SPF) umur 10 hari, vaksin AI inaktif 1 botol, spuit 1 mL, jarum suntik 18 G, spuit 3 mL, iodine, pelubang telur, peneropong telur, *microplate* 96 well V-bottom (Nunc), *multi channel* 10-100 µl, *single channel* 25-100 µl, tips 10-100 µl, *pipet aids*, *pipet measure* 2 mL, *laminar flow*, *shaker*, sentrifus, tabung 1.5 mL, *Red Blood Cell* (RBC) 3 % dan 1%, masker, sarung tangan dan label.

c. Uji Potensi Secara Serologis

Bahan dan alat uji potensi secara serologis yaitu ayam SPF umur 28 hari sebanyak 20 ekor, vaksin AI inaktif 1 botol, spuit 3 mL, jarum suntik 18 G, virus AI H5N1, virus AI H9N2, serum positif AI, serum negatif AI, sampel serum hasil vaksinasi, PBS⁻, RBC 1 %, larutan Alsever, alkohol 70 %, betadine, *microplate* 96 well V-bottom (Nunc), *multi channel* 10-100 µl, *single channel* 25-100 µl, tips 10-100 µl, *pipet aids*, *pipet measure* 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, BSC, *shaker*, kapas alkohol, masker, sarung tangan, *baker plastic* volume 2 L (*autoclavable*).

Metode

1. Metode Sampling

Pengambilan sampel vaksin AI dari Dinas Peternakan atau membeli sampel vaksin AI dari *poultry shop*/depo obat hewan di 7 Provinsi di Indonesia yang dipilih berdasarkan pertimbangan anggaran TP (Tugas Pembantuan) pengendalian AI, yaitu Provinsi Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, dan Kalimantan Selatan. Tiap provinsi diambil tiga botol (triplo) vaksin AI dengan nomor *batch* yang sama dan waktu kadaluarsa tidak kurang dari 6 bulan.

2. Metode Pengujian

a. Uji Hambatan Hemaglutinasi (OIE 2015)

- Uji Hemaglutinasi (HA)
Phospat Buffer Saline pH 7,0-7,4 sebanyak 0,025 mL dimasukkan ke dalam masing-masing lubang pada *microplate*. Antigen AI dimasukkan sebanyak 0,025 mL kedalam lubang pertama *microplate*, kemudian dibuat pengenceran dua kali 0,025 mL. *Phospat Buffer Saline* 0,025 mL dimasukkan pada semua lubang *microplate* dan RBC 1% sebanyak 0,025 mL juga dimasukkan pada semua lubang *microplate*. Selanjutnya dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC⁽⁴⁾.
- Uji Back Titration
Phospat Buffer Saline pH 7,0-7,4 sebanyak 0,025 mL dimasukkan dalam masing-masing lubang pada *microplate* dan virus AI 4 HAU dimasukkan sebanyak 0,025 mL ke dalam lubang pertama *microplate*. Kemudian dibuat pengenceran dua kali 0,025 mL virus dan dimasukkan RBC 1% sebanyak 0,025 mL ke semua lubang *microplate*. Selanjutnya dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC⁽⁴⁾.
- Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)
Phospat Buffer Saline pH 7,0-7,4 sebanyak 0,025 mL dimasukkan dalam masing-masing lubang pada *microplate* dan serum dimasukkan sebanyak 0,025 mL. Kemudian dibuat pengenceran dua kali 0,025 mL serum dan dimasukkan virus 4 HAU ke semua lubang *microplate*. Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (25-27°C), kemudian RBC 1%

sebanyak 0,025 mL dimasukkan ke semua lubang *microplate*. Selanjutnya dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC ⁽⁴⁾.

b. Uji Identifikasi (FOHI 2018)

Prosedur dari uji identifikasi yakni sampel vaksin AI di ekstraksi dengan menggunakan kit ekstraksi RNA (*Qiam Viral RNA mini kit*-Qiagen). Ekstraksi RNA virus yang terkandung dalam vaksin yang nantinya akan menjadi *template* (sampel) sebanyak 5 µL dalam reaksi PCR. Master mix PCR (*superscript III one step RT-PCR with Platinum Taq*-Invitrogen) dicampurkan dengan menggunakan primer spesifik virus AI subtipe H5, N1, H9, N2. Masukkan RNA hasil ekstraksi ke dalam master mix sebagai sampel yang akan diuji.

Selanjutnya proses amplifikasi dengan alat *thermocycler* sesuai protokol yang ditentukan yaitu 1x48°C 3 menit; 1x94°C 2 menit; 40x94°C 30 detik; 50°C 45 detik; 68°C 45 detik; 1x68°C 5 menit. Hasil dari proses amplifikasi PCR dilakukan elektroforesis dengan menggunakan agar 2%. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila menunjukkan hasil positif terhadap H5N1 dengan munculnya pita ampikon pada panjang ampikon sesuai target masing masing primer yang digunakan. Panjang ampikon gen H5 pada 545 *base pair* (bp), gen N1 pada 123 bp, gen H9 pada 682 bp, dan dan N2 pada 362 bp ⁽³⁾.

c. Uji Inaktivasi (FOHI 2018)

Prosedur uji inaktivasi yaitu inokulasi 0,2 mL vaksin AI ke 10 butir TAB SPF via *allantoic cavity*. Selanjutnya inkubasikan pada suhu 37 °C selama 7 hari. Pasase dilakukan sebanyak 3 kali dengan cara yang sama. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat

apabila semua telur yang diinokulasi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji HA ⁽³⁾.

d. Uji Potensi Secara Serologis (FOHI 2007)

Prosedur uji potensi secara serologis yakni sebanyak sepuluh ekor ayam SPF umur 28 hari divaksin AI dengan 1 dosis/ekor dengan rute intramuscular (IM) dan sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kontrol dan tidak divaksinasi. Empat minggu setelah vaksinasi semua ayam diambil darah dan dipisahkan serumnya untuk dilakukan uji serologi dengan menggunakan metode uji hambatan aglutinasi. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila ayam vaksinasi tidak kurang dari 90% mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 1:16 dan semua ayam kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 1:4 ⁽¹⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

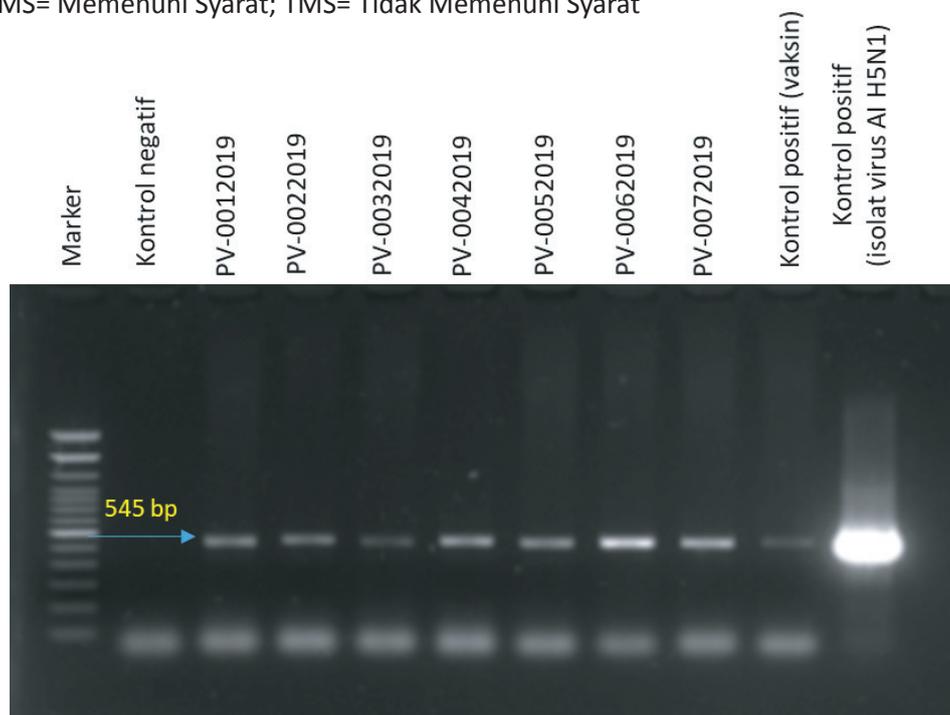
Hasil

Sampel vaksin AI subtipe H5N1 inaktif yang memenuhi kriteria sebanyak 7 sampel yang berasal dari Provinsi Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan Kalimantan Selatan. Sementara dari Provinsi Bali tidak berhasil memperoleh sampel vaksin karena jumlah yang tersedia hanya 1 (satu) botol dari 3 (tiga) botol yang dipersyaratkan. Selanjutnya untuk menentukan mutu sampel vaksin yang didapat dilakukan uji identifikasi dan inaktivasi sesuai dengan FOHI 2018, serta uji potensi secara serologis sesuai dengan FOHI 2007. Hasil rinci pengujian mutu sampel vaksin AI disajikan pada Tabel 1.

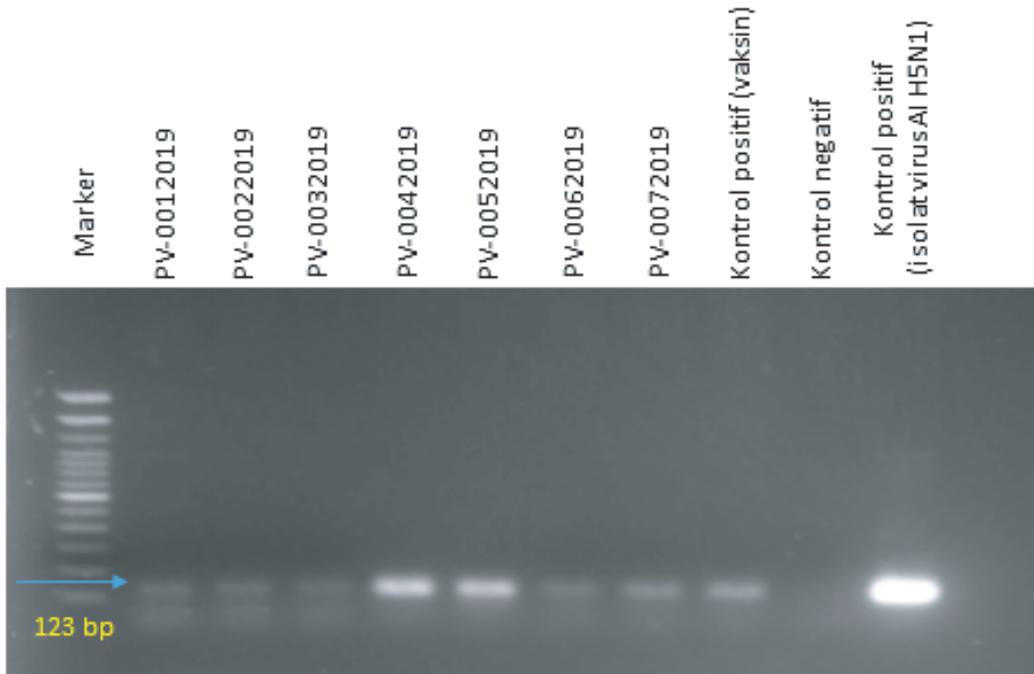
Tabel 1. Hasil Pengujian Mutu Vaksin Avian Influenza sub tipe H5N1 di 7 Provinsi di Indonesia Tahun 2019

No.	Asal Provinsi/ Nomor Uji	Uji Identifikasi Dengan PCR		Uji Inaktivasi	Uji Potensi Secara Serologis		HASIL
		AI H5N1	AI H9N2		AI H5N1 (titer ≥ 16)	AI H9N2 (titer ≥ 128)	
1	Sumatera Barat/ PV- 0052019	Positif H5 : 545 bp N1 : 123 bp	Negatif	100% negatif HA	100%	-	MS
2	Sumatera Selatan/ PV- 0032019	Positif H5 : 545 bp N1 : 123 bp	Positif H9: 682 bp N2: 362 bp	100% negatif HA	100%	100%	TMS
3	Jawa Barat/ PV- 0062019	Positif H5 : 545 bp N1 : 123 bp	Negatif	100% negatif HA	80%	-	TMS
4	Jawa Tengah/ PV- 0012019	Positif H5 : 545 bp N1 : 123 bp	Negatif	100% negatif HA	100%	-	MS
5	DIY/ PV- 0022019	Positif H5 : 545 bp N1 : 123 bp	Negatif	100% negatif HA	100%	-	MS
6	Jawa Timur/ PV- 0042019	Positif H5 : 545 bp N1 : 123 bp	Negatif	100% negatif HA	100%	-	MS
7	Kalimantan Selatan/ PV- 0072019	Positif H5 : 545 bp N1 : 123 bp	Negatif	100% negatif HA	100%	-	MS

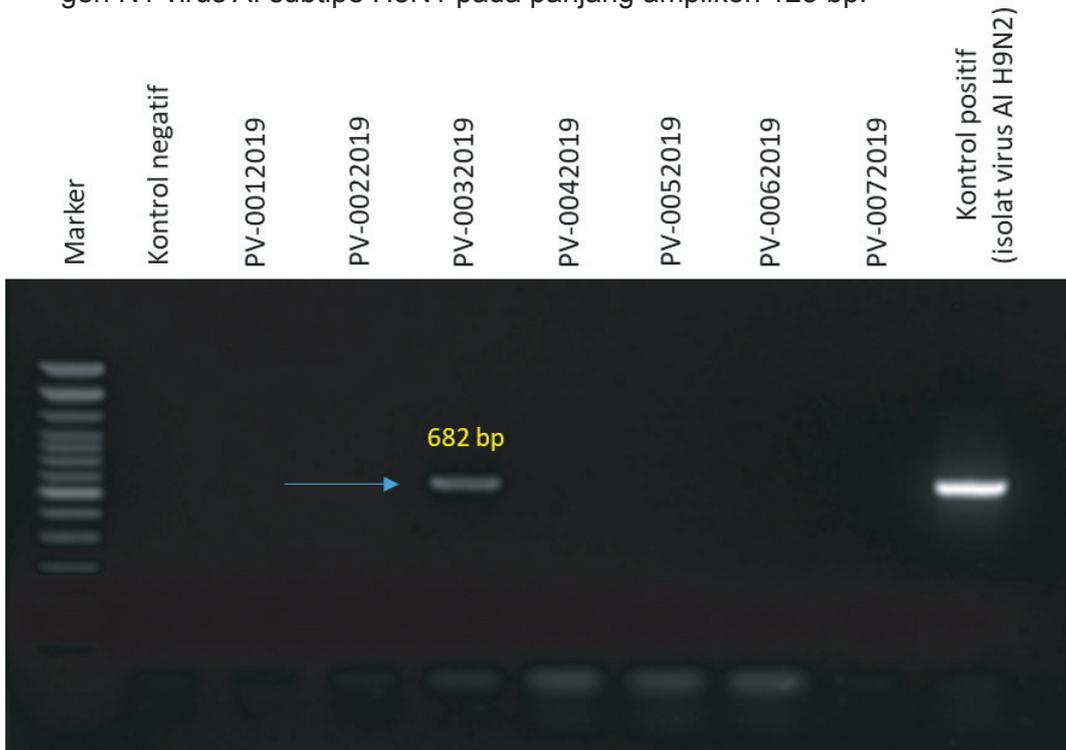
Keterangan: MS= Memenuhi Syarat; TMS= Tidak Memenuhi Syarat



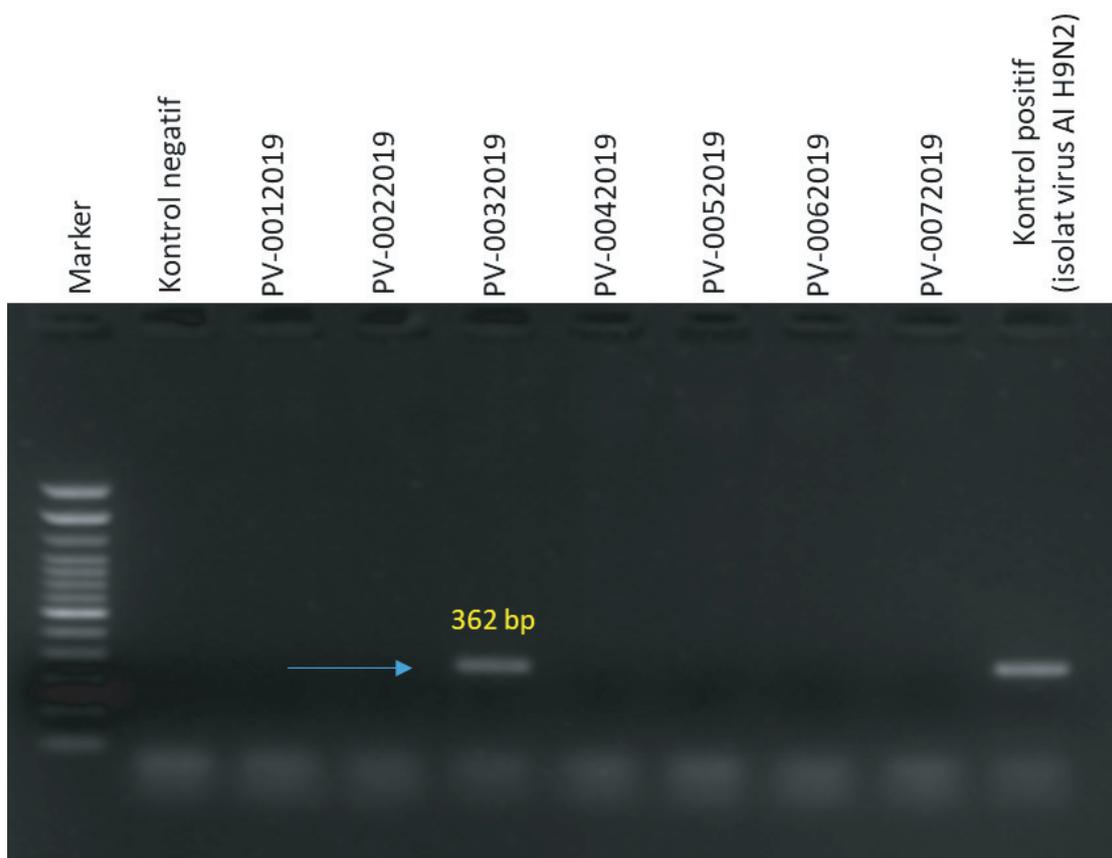
Gambar 1. Hasil PCR amplifikasi gen H5 virus AI sub tipe H5N1 pada panjang amplicon 545 bp (n=7). Sebanyak 7 vaksin AI H5N1 menunjukkan hasil positif memiliki gen H5 pada panjang amplicon 545 bp. Kontrol negatif menunjukkan hasil negatif. Kontrol positif virus AI sub tipe H5 dari vaksin dan isolat virus H5N1 menunjukkan hasil positif memiliki gen H5 virus AI sub tipe H5N1 pada panjang amplicon 545 bp.



Gambar 2. Hasil PCR amplifikasi gen N1 virus AI sub tipe H5N1 pada panjang amplicon 123 bp (n=7). Sebanyak 7 vaksin AI H5N1 menunjukkan hasil positif memiliki gen N1 pada panjang amplicon 123 bp. Kontrol negatif menunjukkan hasil negatif. Kontrol positif virus AI subtype H5 dari vaksin dan isolat virus H5N1 menunjukkan hasil positif memiliki gen N1 virus AI sub tipe H5N1 pada panjang amplicon 123 bp.



Gambar 3. Hasil PCR amplifikasi gen H9 virus AI sub tipe H9N2 pada panjang amplicon 682 bp (n=7). Terdapat 1 vaksin AI sub tipe H5N1 menunjukkan hasil positif memiliki gen H9 pada panjang amplicon 682 bp, sedangkan 6 vaksin AI sub tipe H5N1 negatif terhadap gen H9. Kontrol negatif menunjukkan hasil negatif. Kontrol positif menggunakan isolat virus AI sub tipe H9N2 menunjukkan hasil positif memiliki gen H9 pada panjang amplicon 682 bp.



Gambar 4. Hasil PCR amplifikasi gen N2 virus AI subtipe H9N2 pada panjang amplicon 362 bp (n=7). Terdapat 1 vaksin AI subtype H5N1 menunjukkan hasil positif memiliki gen N2 pada panjang amplicon 362 bp, sedangkan 6 vaksin AI subtype H5N1 negatif terhadap gen N2. Kontrol negatif menunjukkan hasil negatif. Kontrol positif menggunakan isolat virus AI subtipe H9N2 menunjukkan hasil positif memiliki gen N2 pada panjang amplicon 362 bp.

Uji identifikasi vaksin AI dengan metode PCR

Berdasarkan uji identifikasi vaksin AI yang tersaji dalam Tabel 1 dan Gambar 1-4 diperoleh hasil sebagai berikut:

- Seluruh sampel (7 vaksin) positif terhadap AI subtipe H5N1.
- Sampel vaksin dari Sumatera Selatan selain positif terhadap virus AI subtipe H5N1 juga positif terhadap virus AI subtipe H9N2.
- Sampel vaksin positif terhadap virus AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2 berjumlah 1 (satu), yaitu sampel vaksin dari Provinsi Sumatera Selatan.

Uji inaktivasi vaksin AI

Uji inaktivasi dilakukan melalui 3 kali pasase pada telur ayam SPF umur 10 hari. Hasil uji inaktivasi menunjukkan semua sampel vaksin 100% negatif HA sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Uji potensi vaksin AI

Uji potensi vaksin AI dilakukan dengan uji serologis. Tabel 1 menyajikan data hasil uji potensi sebagai berikut:

- Sampel vaksin yang 100% positif terhadap virus AI subtipe H5N1 dan negatif terhadap virus AI subtipe H9N2 berjumlah 5 (lima), yaitu sampel vaksin dari Provinsi Sumatera Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, dan Kalimantan Selatan.
- Sampel vaksin yang 80% positif terhadap virus AI subtipe H5N1 dan negatif terhadap virus AI subtipe H9N2 berjumlah 1 (satu), yaitu sampel vaksin dari Provinsi Jawa Barat.
- Sedangkan 1 (satu) sampel vaksin yang berasal dari Sumatera Selatan menunjukkan 100 % positif terhadap virus AI subtipe H9N2 selain H5N1.

PEMBAHASAN

Pengujian mutu sampel vaksin AI sub tipe H5N1 yang berasal dari 7 provinsi di Indonesia telah dilakukan uji identifikasi, uji inaktivasi, dan uji potensi. Uji inaktivasi dilakukan pada vaksin inaktif yang mengandung virus patogen bersifat zoonotik, 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. Sedangkan uji potensi dilakukan untuk mengetahui terbentuknya titer antibodi yang cukup untuk menimbulkan kekebalan terhadap virus AI. Uji inaktivasi dilakukan dengan menginokulasi vaksin ke dalam telur ayam SPF tertunas. Hasil uji dinyatakan memenuhi syarat apabila semua telur yang diinokulasi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui adanya perubahan embrio maupun dengan uji hemaglutinasi⁽³⁾. Berdasarkan hasil pengujian inaktivasi sebagaimana tersaji dalam Tabel 3 menunjukkan bahwa seluruh vaksin AI yang diuji 100% negatif HA artinya proses inaktivasi vaksin oleh produsen telah dilakukan secara sempurna, sesuai dengan interpretasi hasil dalam FOHI 2018⁽³⁾. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin tersebut aman untuk diaplikasikan karena telah inaktif sempurna dan vaksin itu aman terhadap lingkungan.

Uji identifikasi penting dilakukan untuk melihat kemurnian suatu vaksin. Tabel 1 menunjukkan bahwa uji identifikasi terhadap seluruh sampel vaksin yang diuji positif virus AI sub tipe H5N1. Berdasarkan uji identifikasi dengan metode PCR, hasil positif virus AI sub tipe H5N1 ditunjukkan pada 545 bp untuk H5 dan 123 bp untuk N1. Hal ini menunjukkan bahwa *seed* vaksin yang digunakan adalah virus AI sub tipe H5N1 sesuai dengan *seed* yang tertera pada label vaksin. Hanya saja pada 1 (satu) sampel yang berasal dari Provinsi Sumatera Selatan selain positif virus AI sub tipe H5N1 juga menunjukkan hasil positif virus AI sub tipe H9N2 pada 682 bp untuk H9 dan 362 bp untuk

N2 (Gambar1-4). Dengan demikian vaksin tersebut tidak murni hanya mengandung virus AI sub tipe H5N1 dan terjadi ketidaksesuaian antara hasil pengujian dengan pernyataan komposisi/kandungan di label. Ketidakmurnian kandungan virus dapat diakibatkan oleh karena proses pemurnian virus yang tidak sempurna atau sengaja ditambahkan virus lain pada saat proses produksi vaksin.

Uji potensi dilakukan dengan menyuntikkan sebanyak 1 dosis vaksin AI pada ayam SPF umur 4 minggu. Berdasarkan FOHI 2007, vaksin AI memenuhi syarat apabila minimal 90% titer antibodi positif AI sub tipe H5N1 memiliki titer minimal 16 (≥ 16). Titer antibodi diukur dengan uji hambatan aglutinasi menggunakan 2 macam antigen sub tipe AI, yaitu H5N1 dan H9N2. Tabel 1 menunjukkan bahwa 5 sampel vaksin AI yaitu yang berasal dari Provinsi Sumatera Barat, Jawa Tengah, DIY, Jawa Timur, dan Kalimantan Selatan memenuhi syarat uji potensi karena 100% ayam memiliki titer antibodi terhadap virus AI sub tipe H5N1 lebih dari 16 dan negatif terhadap virus AI sub tipe H9N2.

Hasil uji potensi vaksin AI yang berasal dari Sumatera Selatan selain menunjukkan hasil 100% memiliki titer antibodi terhadap antigen H5N1 lebih dari 16, juga menunjukkan hasil 100% memiliki titer antibodi terhadap antigen H9N2 lebih dari 128. Hal ini menunjukkan bahwa sampel vaksin mengandung virus AI sub tipe H5N1 dan AI sub tipe H9N2, sehingga tidak sesuai dengan label vaksin AI yang menyatakan hanya mengandung AI sub tipe H5N1. Hasil ini memperkuat hasil dari uji identifikasi yang juga menunjukkan bahwa sampel vaksin tidak hanya mengandung virus AI sub tipe H5N1

Sampel vaksin dari Jawa Barat tidak memenuhi syarat karena hanya 80% serum darah ayam yang memiliki titer antibodi terhadap virus AI sub tipe H5N1 lebih dari 16 (Tabel 1). Beberapa hal yang dapat menyebabkan rendahnya serum darah ayam pasca vaksinasi yang mempunyai titer minimal 16 antara lain akibat penanganan rantai dingin penanganan vaksin yang tidak sesuai dengan SOP mulai dari

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

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Hasil pengujian mutu vaksin AI dari 7 provinsi di Indonesia menunjukkan bahwa 5 dari 7 sampel yang diuji Memenuhi Syarat (MS) berdasarkan hasil rangkaian uji identifikasi, uji inaktivasi, dan uji potensi. Sampel vaksin AI tersebut berasal dari Provinsi Sumatera Barat, Jawa Tengah, DI Yogyakarta, Jawa Timur, dan Kalimantan Selatan.
2. Sampel vaksin AI yang dikoleksi dari Provinsi Sumatera Selatan Tidak Memenuhi Persyaratan (TMS) karena hasil uji secara molekuler dan serologis terbukti tidak murni mengandung virus AI subtipe H5N1 sebagaimana informasi yang tertera pada label kemasan. Terindikasi adanya kandungan virus AI subtipe H9N2.
3. Sampel vaksin AI yang dikoleksi dari Provinsi Jawa Barat Tidak Memenuhi Persyaratan (TMS) karena hasil uji potensinya 80%, di bawah persyaratan mutu minimal 90 %.
4. Temuan sampel vaksin AI yang TMS dapat

disebabkan oleh:

- a. Proses produksi vaksin yang tidak sesuai dengan tujuan awal produksi vaksin saat registrasi, sehingga terjadi penambahan agen patogen (zat aktif) selain yang diinformasikan pada label kemasan.
- b. Penurunan mutu vaksin akibat proses produksi atau penerapan rantai dingin dalam penanganan distribusi dan peredaran vaksin yang tidak sesuai SOP.

Saran

1. Pengawasan peredaran mutu dan legalitas vaksin AI yang beredar di Indonesia perlu ditingkatkan dengan lebih mengoptimalkan jejaring pengawasan obat hewan baik di tingkat Pusat, provinsi dan kabupaten/kota.
2. Kegiatan pengkajian vaksin AI dan serum pasca vaksinasi perlu didukung oleh adanya *national sampling plan* agar jumlah sampel yang diuji mewakili kondisi nyata di lapangan, baik yang berasal dari pasif servis (pelayanan Kiriman Daerah/KD) atau aktif servis.
3. Untuk memberikan dukungan kepada BBPMSOH dalam mencapai target sampel dan target PNBPN yang ditetapkan, diharapkan agar ke depan dapat dialokasikan anggaran Tugas Pembantuan (TP) untuk pengiriman dan pengujian vaksin AI di BBPMSOH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam kegiatan pengkajian ini, terutama pihak dinas provinsi dan kabupaten yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan Provinsi Sumatera Barat, Provinsi Sumatera Selatan, Provinsi Jawa Barat, Provinsi Jawa Tengah, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta, Provinsi

Jawa Timur, dan Provinsi Kalimantan Selatan, yang telah memfasilitasi proses pengambilan sampel.

DAFTAR PUSTAKA

1. [Ditjennak]. 2007. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 3.
2. [Ditjennak]. 2017. Peta Status dan Situasi Penyakit Hewan Nasional.
3. [Ditjennak]. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 5.
4. [OIE] Office International Des Epizooties. 2015. OIE Terrestrial Manual. Avian Influenza. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14._ND.pdf.
5. Lee CW, Saif YM. 2009. Avian Influenza Virus. *J. of Comparative Imm., Micr and Infect Dis* (32). hal: 301-310.

MELAKSANAKAN PENGUJIAN MUTU, SERTIFIKASI, PENGKAJIAN, DAN PEMANTAUAN OBAT HEWAN



LAYANAN-LAYANAN BBPMSOH :

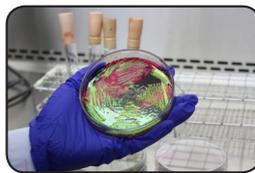
A. PENGUJIAN DAN SERTIFIKASI



Pengujian Obat Hewan



Pengajuan Permohonan Pengujian menggunakan Aplikasi SIHAPSOH



Pengkajian Obat Hewan



Pemantauan Obat Hewan



Sertifikasi Obat Hewan

B. BIMBINGAN TEKNIK



C. KONSULTASI, EXPERTISE, NARASUMBER



F. KEGIATAN LAIN



Kunjungan DIRJEN PKH

D. PENYEDIAAN HEWAN PERCOBAAN, STANDAR UJI, SEED VIRUS DLL



Kerjasama BBPMSOH- ASOHI

E. KERJASAMA TEKNIS (NASIONAL DAN INTERNASIONAL)



Obat Hewan Berkualitas
Masyarakat Aman
& Cerdas



BBPMSOH

BALAI BESAR PENGUJIAN MUTU DAN SERTIFIKASI OBAT HEWAN

Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian

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

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

 @bbpmsohgunungsindur  @bbpmsoh_  @bbpmsoh1  BBPMSOH Gunungsindur

