



Metode Deteksi Residu Antimikroba

Oleh : Attya Asuh Insani, S.T

Resistensi antibiotik adalah masalah internasional yang menimbulkan ancaman langsung terhadap kesehatan global, pertanian dan biosekuriti (diulas dalam Holmes dkk. 2016). Seiring dengan pertumbuhan populasi dunia, praktik produksi hewan perlu menjadi lebih intensif dan efisien, dan mungkin dibarengi dengan meningkatnya permintaan akan perlakuan dengan obat-obatan. Saat ini, sekitar 80% dari semua hewan ternak menerima pengobatan selama sebagian besar hidupnya. Oleh karena itu, tuntutan untuk metode analisis residu antimikroba pada pangan asal hewan yang andal, sederhana, sensitif, cepat dan berbiaya rendah akan terus berkembang.

Idealnya, metode ini harus sensitif terhadap konsentrasi antibiotik yang tidak mematikan dan memerlukan keahlian teknis minimal. Selain itu, faktor-faktor seperti biaya, selektivitas, keamanan hayati dan kemampuan multipleks harus dievaluasi dalam konteks penggunaan di lapangan. Berdasarkan kriteria ini, maka metode uji analisis residu dapat dikategorikan ke dalam pengujian mikrobiologi, pengujian fisik dan kimia, *immune-assay*, aptasensor dan biosensor.

1. Uji Mikrobiologi

Uji mikrobiologi adalah metode paling awal yang digunakan untuk mendeteksi residu antibiotik dan masih digunakan secara luas. Ada dua teknik pengujian, yang pertama adalah teknik *disk diffusion*. Prinsip pengujiannya adalah dengan menginokulasi bakteri spesifik pada media agar,

kemudian sampel langsung diaplikasikan di atas media tersebut atau menggunakan *cylinder cup* atau *paperdisc* yang ditetes sampel. Pertumbuhan bakteri akan terhambat di sekitar sampel (terbentuk zona *clear*) jika mengandung zat antimikroba (Pikkemat, 2009). Teknik kedua menggunakan bakteri tertentu yang diketahui sensitif terhadap antibiotik yang telah direkayasa untuk menghasilkan keluaran kolorimetri. Reaksi perubahan warna ini dapat dianalisis secara kuantitatif dengan spektrofotometri untuk menentukan konsentrasi antibiotik yang ada dalam sampel setelah inkubasi (Parthasarathy R, 2018).

Sebagai teknik standar, uji mikrobiologi saat ini tersedia secara komersial, dan telah dioptimalkan untuk menguji sampel makanan dan minuman, khususnya sampel susu dan serum, untuk menentukan apakah terdapat tingkat antibiotik yang relevan secara fisiologis. Contoh uji mikrobiologi komersial yang biasa digunakan untuk susu atau jaringan meliputi *Delvotest P*, *Swab Test On Premises* (*STOP test*), *Brilliant Black Reduction Test* (*BR test*), *Calf Antibiotic Sulfa Test* (*CAST test*), *Disk Assay for Milk*, *Live Animal Swab Test* (*LAST test*) dan *the CHARM Farm Test*.

Kelemahan utama dari uji mikrobiologi adalah bahwa metode ini tidak terlalu spesifik untuk tujuan identifikasi antibiotik, bersifat kualitatif, memiliki tingkat deteksi terbatas terhadap banyak antibiotik dan memerlukan beberapa jam sebelum hasilnya tersedia karena memerlukan inkubasi. Selain itu, pengujian mikrobiologi biasanya memerlukan

peralatan yang signifikan dan fasilitas laboratorium yang steril sehingga relatif tidak cocok untuk analisis lapangan di lapangan. Keuntungan utama dari pengujian ini adalah biayanya yang murah, mudah dilakukan, dapat disesuaikan dengan skrining sampel dalam jumlah besar dan mempunyai spektrum deteksi antimikroba yang cukup luas.

2. Pengujian Fisik dan Kimia

Pengujian fisik dan kimia berbeda dengan pengujian mikrobiologi, yang dibatasi oleh sensitivitas bakteri terhadap antibiotik, pengujian fisik dan kimia menargetkan sifat spesifik molekul seperti ukuran, muatan, karakteristik pengikatan atau sifat reaktif untuk mengidentifikasi antibiotik dalam sampel yang beragam.

Pemurnian fisik memerlukan pemisahan antibiotik dari kotoran lain dalam sampel untuk memungkinkan isolasi unsur yang diinginkan melalui fraksinasi berulang. Fraksi akhir untuk pemurnian antibiotik dianalisis menggunakan alat kromatografi. Ada beberapa jenis metode kromatografi yang saat ini digunakan untuk analisis residu. Antara lain : GC (kromatografi gas), TLC (kromatografi lapis tipis), TLC/BA (kromatografi lapis tipis/bioautografi), HPLC (kromatografi cair tekanan tinggi atau kinerja tinggi) dan *Liquid Chromatography/Mass-Spectrometry* (LC/MS). Karena sebagian besar antibiotik bersifat polar, non-volatil dan sensitif terhadap panas, HPLC dan LC/MS adalah metode deteksi yang paling umum digunakan untuk analisis residu.

Pengujian fisik dan kimia relatif lebih mahal dan memerlukan instrumentasi serta keterampilan teknis yang lebih kompleks dibandingkan metode analisis lainnya. Penggunaannya sebagai tes skrining tidak direkomendasikan. Namun, kemampuan metode kromatografi untuk secara spesifik mengidentifikasi dan mengukur tingkat residu yang sangat rendah telah menyebabkan

penggunaannya terutama sebagai uji konfirmasi untuk uji skrining sampel positif.

3. Immunoassay

Immunoassay merupakan tes kimia bergantung pada reaksi antigen dan antibodi. *Immunoassay* dapat bersifat sifat kualitatif atau kuantitatif dengan perbedaan maksud atau tujuan. Prinsip uji *Immunoassay* adalah penggunaan antibodi secara khusus untuk mengikat antigen yang diinginkan. *Immunoassay* memberikan deteksi antibiotik yang sangat sensitif dan spesifik dalam sampel cair atau padat yang diproses, dengan mengandalkan spesifisitas interaksi antara antibodi dan molekul yang diinginkan. *Immunoassay* biasanya memiliki keluaran kolorimetri namun ada juga yang memiliki keluaran *fluorescent* atau *chemiluminescent*, bergantung pada molekul reporter yang digunakan .

Immunoassay untuk deteksi antibiotik, khususnya ELISA, telah diadaptasi untuk sampel tanah, makanan, dan air. Selain itu, ELISA juga tersedia secara komersial yang dikembangkan untuk sampel makanan dan telah digunakan dalam studi lapangan. Beberapa contoh alat tes komersial yang biasa digunakan untuk pengujian residu obat dalam susu dan tisu antara lain tes Lactek untuk susu dan *Cite Sulfa Trio* dan *EZ-Screen Quik Card* untuk berbagai jenis matriks.

ELISA adalah teknik verifikasi yang ampuh namun merupakan metode yang lumayan mahal yang tidak tersedia di semua laboratorium. Untuk uji residu obat, karena selektivitas dan sensitivitasnya, ELISA merupakan metode deteksi yang sangat baik (Mashak dkk, 2017). Metode ELISA memerlukan keahlian ilmiah tingkat sedang untuk menyelesaikan prosedurnya, serta biaya dan peralatan yang lebih murah dibandingkan dengan analisis kromatografi dengan preparasi sampel yang lebih mudah dan cepat (tidak ada prosedur ekstraksi fase padat (SPE)) (Gaudin dkk., 2020).

4. Biosensor

Biosensor merupakan adalah metode inovatif di bidang skrining antibiotik dalam makanan dan banyak bidang analisis lainnya. Instrumen biosensor terdiri dari dua komponen utama : elemen bioreseptor atau biorekognisi yang mengenali analit target dan transduser untuk mengubah peristiwa pengenalan menjadi sinyal terukur . Biosensor menawarkan kecepatan, keandalan, biaya rendah dan nilai uang yang baik serta dapat dengan mudah diterapkan oleh personel tanpa keterampilan khusus (Gaudin, 2017). Biosensor telah diadaptasi untuk sampel susu, air, serum dan daging serta telah diterapkan dalam studi lapangan untuk mendeteksi antibiotik.

Meskipun metode analisis ini dapat meningkatkan identifikasi antibiotik dari keluaran biosensor, fluoresensi dan bioluminesensi masih sulit untuk dinilai secara tepat di lapangan. Hambatan lain dalam penerapan di lapangan adalah portabilitas biosensor bakteri di luar laboratorium. Karena biosensor ini bergantung pada bakteri sehat, fungsi dari banyak biosensor yang ada akan optimal pada suhu 37°C dan oleh karena itu memerlukan inkubator.

Namun, perkembangan terkini dengan memanfaatkan kemampuan alami beberapa sel bakteri adalah 'sporosensor', yaitu perangkat yang mudah digunakan dan siap digunakan di lapangan, berisi spora bakteri yang tidak dapat bergerak dari *Bacillus subtilis* hasil rekayasa genetika yang bertindak sebagai biosensor. Meskipun hanya diuji pada bacitracin dengan LOD sekitar 50 ng/mL, ia dirancang khusus agar mudah digunakan di lapangan hanya menggunakan tiga tabung dan reagen terbatas.

Biosensor kolorimetri *paper-based* termasuk 'sporosensor' telah menunjukkan desain inovatif dan fungsionalitas serta kegunaan yang menjanjikan, namun masih bekerja paling baik pada

suhu 37°C karena menggunakan sel bakteri hidup. Penelitian terbaru biosensor *paper-based* telah berhasil dikembangkan dengan sistem transkripsi/translasi *in vitro* untuk mendeteksi antibiotik yang menghambat sintesis protein. Meskipun perangkat berfungsi paling efisien pada suhu 37°C (inkubasi 2 jam), deteksi pada sensitivitas yang sebanding dapat secara konsisten dicapai pada suhu serendah 15°C dengan memvariasikan waktu inkubasi. Sistem *paper-based* ini menunjukkan potensi untuk digunakan di lapangan.

5. Aptasensor

Aptasensor merupakan biosensor berbasis aptamer, baru-baru ini dibuat untuk identifikasi antibiotik. Aptamers adalah oligonukleotida beruntai tunggal (RNA atau DNA) yang dapat berikatan dengan berbagai molekul target dengan sensitivitas, selektivitas dan afinitas tinggi seperti ion logam, protein, asam nukleat dan molekul kecil lainnya. Aptamers merupakan pengganti antibodi yang potensial untuk sebagian besar aplikasi karena keunggulannya dibandingkan antibodi. Sebuah teknik yang dikenal sebagai *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) dapat digunakan untuk menemukan aptamers yang cocok (Kakimova dkk, 2022).

Aptasensor dibuat dengan berbagai jenis transduser yang peka secara elektrokimia, optik, dan *massa*. Banyak biosensor yang diproduksi baru-baru ini berdasarkan aptamers untuk deteksi antibiotik yang telah direferensikan yang disusun berdasarkan kelas antibiotik. Biosensor aptamer elektrokimia adalah yang paling umum digunakan untuk mendeteksi antibiotik karena biayanya yang rendah, mobilitas, sensitivitas tinggi dan kesederhanaan operasional, namun memiliki keterbatasan yang signifikan dalam kemampuannya menguji berbagai antibiotik secara bersamaan. Selain itu, aptasensor saat ini memerlukan pelatihan dan reagen serta peralatan deteksi yang

signifikan. Oksitetrasiklin, tetrasiklin, kloramfenikol dan Kanamisin adalah beberapa antibiotik yang paling banyak dipelajari yang terdeteksi oleh aptasensor.

Saat ini, aptasensor *paper_based* telah dirancang agar lebih mudah dibawa yang ideal untuk mendeteksi antibiotik konsentrasi rendah di lapangan. Selain itu, aptasensor memiliki prosedur yang relatif singkat, mulai dari 30 menit hingga 2 jam, yang berguna untuk mengambil banyak sampel di lapangan. Diadaptasi untuk menguji konsentrasi antibiotik dalam sampel susu, serum dan air, aptasensor mampu mendeteksi antibiotik secara efektif dalam matriks kompleks.

Dengan berbagai macam metode uji deteksi residu antimikroba yang terus berkembang, maka perlu untuk menggabungkan metode ke dalam "sistem terintegrasi" di mana sejumlah pengujian berbeda diterapkan secara berurutan tergantung pada tujuan analisis. Untuk tujuan regulasi, strategi tersebut harus mencakup setidaknya dua atau lebih metode independen: 1. Skrining dengan metode yang dioptimalkan untuk mencegah hasil negatif palsu dan dengan jumlah hasil positif palsu yang dapat diterima dengan biaya rendah (misalnya, uji mikrobiologi); 2. Uji antara untuk mengidentifikasi jenis residu (misalnya, ELISA); 3. Konfirmasi kuantitatif, dengan metode independen yang dioptimalkan untuk mencegah hasil positif palsu (misalnya kromatografi). Metode seperti ini biasanya mempunyai *throughput* sampel yang rendah dan biaya tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Gaudin ,V. 2017. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review, *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 90. 15 April 2017. Pages 363-377

Gaudin ,V. Hédou ,C. Rault ,A. Verdon, ., and Soumet ,C. 2020. Evaluation of three ELISA kits for the screening of colistin residue in

porcine and poultry muscle according to the European guideline for the validation of screening methods, *Food Additives & Contaminants: Part A*. DOI: 10.1080/19440049.2020.1778191

Kakimova ,Z. Zharykbasova ,K. Kakimov, A. Mirasheva, G. Oleunekova, S. Zharykbasov, Y. Tulkebayeva, G. Muratbayev, A. Utegenova, A. 2022. Study on the detection of antibiotics in food based on enzyme - free labelless aptamer sensor. *Food Sci. Technol* 42

Mitchell, J. M. Griffiths ,M. W. McEwen ,S. A. McNab ,W. B.. and Yeei, A. J. 1998, Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *Journal of Food Protection*. Vol. 61. No.6. Pages 742-756

Mashak Z., MojaddarLangroodi A., Mehdizadeh T., Ebadi Fathabad A., HoomanAsadi A., 2017, Detection of quinolones residues in beef and chicken meat in hypermarkets of Urmia, Iran using ELISA, *Iran Agricultural Research*(2017)36(1)73-77

Parthasarathy R, Monette CE, Bracero S, Saha MS., 2018, Methods for field measurement of antibiotic concentrations: limitations and outlook, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 94, Issue 8, August 2018, fiy105, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy105>

Pikkemaat M.G., 2009, Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals, *Anal Bioanal Chem* (2009) 395:893–905

