

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

Ernes Andesfha¹, Joen Firmanta P¹, Istiyaningsih¹, Dina Kartini¹, Sarji¹, Meutia Hayati¹, Deden Amijaya¹, Neneng Atikah¹, Citra Patrianegari¹, Sri Arofah²

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

ABSTRAK

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

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

ABSTRACT

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

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

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

PENDAHULUAN

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

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

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

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

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

METODE

Waktu, Tempat dan Lingkup Pengkajian

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

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

Bahan dan Alat

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

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

Sampel Pengkajian

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

Ekstraksi Vaksin Virus Live

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

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

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

Deteksi Kontaminasi Bakteri *Mycoplasma gallisepticum*

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

master mix PCR menggunakan GoTaq® Green Master Mix Kit dengan volume total 19µl yang terdiri dari 9.375µl GoTaq® Green master mix, 0.75µl primer forward (10µM) 5'-GGATCCCATCTCGACCACGACAAA3', dan 0.75 µl primer reverse (10µM) 5'-CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA-3'⁽⁸⁾, 4.125µl dH₂O dan 4µl DNA template. Proses PCR dilakukan dengan siklus pre denaturasi 95°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 54°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Pembacaan hasil PCR melalui tahap elektroforesis menggunakan agarose gel 1.5%, pewarnaan SYBR safe dan marker 100bp menggunakan mesin gel documentation system. Hasil positif adanya kontaminasi bakteri *Mycoplasma gallisepticum* ditunjukkan dengan munculnya pita dengan panjang ampikon 723 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

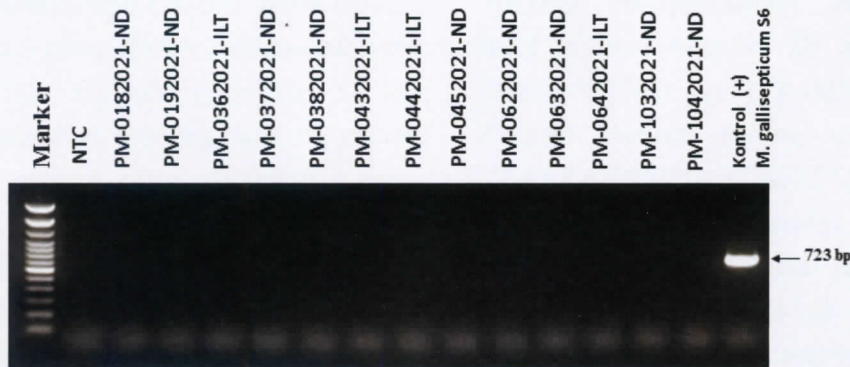
Sebanyak 26 sampel vaksin virus live diuji kontaminasi *M. gallisepticum* dengan menggunakan metode PCR dan hasilnya 100% sampel vaksin tidak terdapat kontaminasi bakteri *M. gallisepticum*, hal ini terlihat pada hasil elektroforesis yang tidak menunjukkan pita ampikon pada Gambar 1 dan 2. Non template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

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

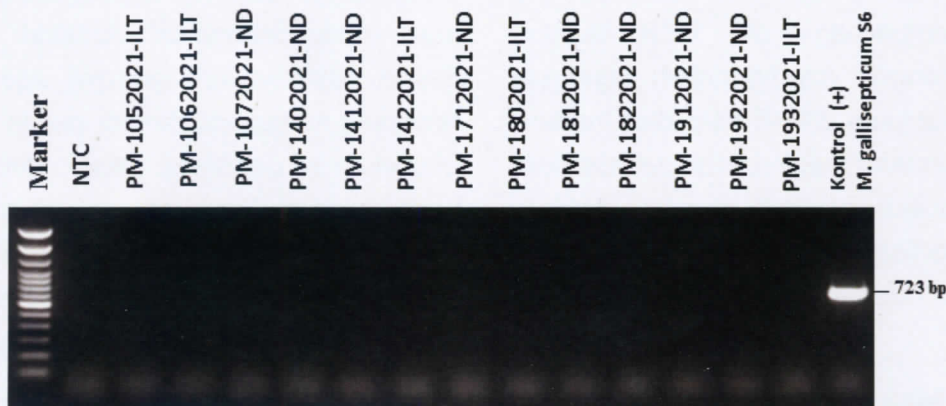
Mycoplasma. Hal ini menimbulkan kekhawatiran akan keamanan vaksin yang diproduksi dalam sel⁽¹¹⁾, sehingga menjadi persyaratan untuk pengujian *Mycoplasma* terhadap substrat sel yang digunakan serta produk biologik yang diproduksi dari substrat sel⁽¹⁴⁾.

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

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



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



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

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

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

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

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

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

negatif berupa *distillated water* (DW) steril diambil @ 1 mL dan diinokulasi ke dalam 20 mL media PPLO broth dan diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Biakan vaksin, kontrol positif dan kontrol negatif dalam PPLO broth dipasase (diinokulasikan) kembali 1 mL ke dalam 10 mL media PPLO broth, pasase dilakukan dengan cara yang sama sebanyak 3 kali dengan interval 7 hari. Pada pasase terakhir diambil 0.1 mL dan diinokulasikan pada media PPLO agar dan diinkubasikan pada 37°C 5% CO₂ selama 10 hari ⁽³⁾.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KESIMPULAN

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

DAFTAR PUSTAKA

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

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