

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

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

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

*email: ernes.andesfhaa@gmail.com

ABSTRAK

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: antibiotics, safety, quality, probiotics, resistance

PENDAHULUAN

Latar Belakang

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

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

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

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

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

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

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

MATERI DAN METODE

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

MATERI

Bahan dan Alat

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

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

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

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

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

METODE

1. Uji Fisik

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

2. Uji Kontaminasi

Sampel yang telah diencerkan pada uji

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

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

3. Uji Kandungan Bakteri, Kapang dan Khamir

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Uji Sensitifitas Antibiotik

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

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

Stock solution antibiotik dibuat pada

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

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

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

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

6. Uji Identifikasi Gen Penyandi Resistansi

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

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

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

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

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

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

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

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

Penarikan beberapa produk probiotik

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

Tabel 3. Hasil Uji Mutu Produk Probiotik

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

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

2. Uji Kandungan Bakteri Probiotik

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

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

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

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

Tabel 4 Jenis Sediaan Sampel Probiotik dan Hasil Uji Kandungan

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

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

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

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

3. Identifikasi Kandungan Bakteri Probiotik

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

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

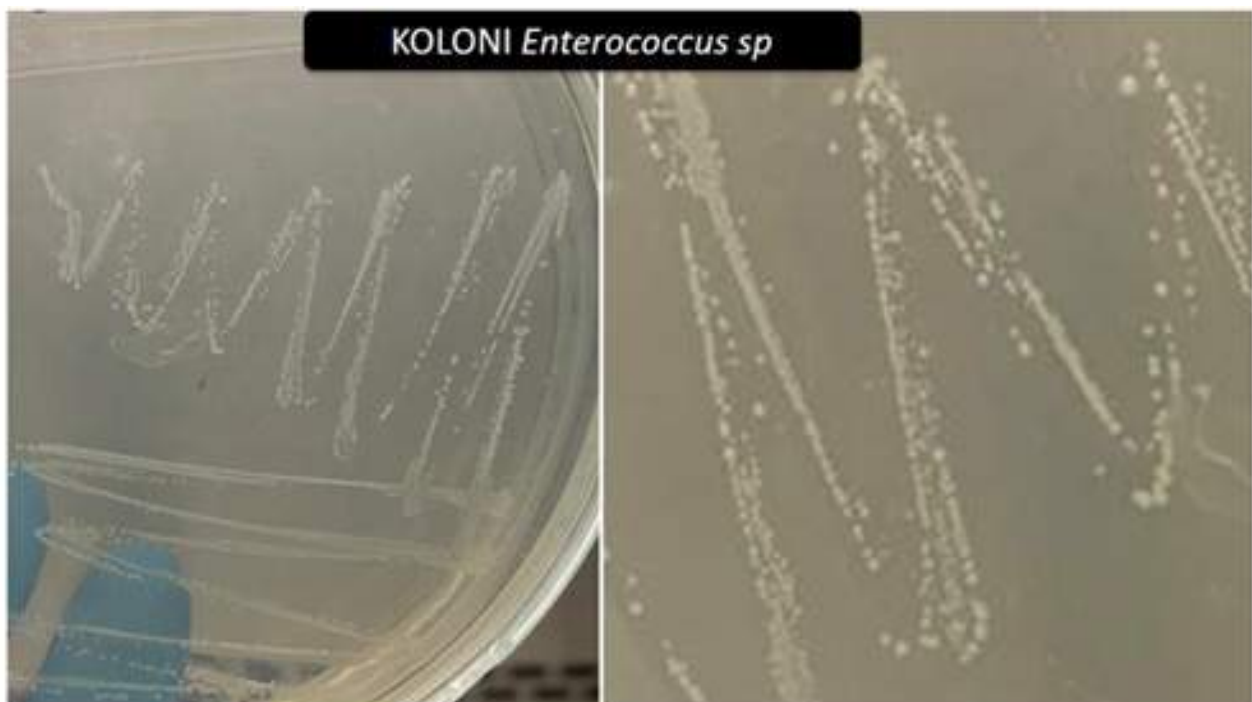
Identifikasi koloni bakteri dari sampel probiotik yang mengandung 3-4 jenis bakteri dilakukan dengan cara mengamati koloni bakteri

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

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

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

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



Gambar 1. Morfologi Koloni Bakteri *Enterococcus sp*

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

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

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

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

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

4. Pengujian Sensitifitas Antibiotik dan Deteksi Gen Penyandi Resistansi

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

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

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

Tabel 6. Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik Bakteri *Enterococcus*

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

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

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

Tabel 7. Hasil Identifikasi Gen Penyandi Resistansi.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KESIMPULAN DAN SARAN

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

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

DAFTAR PUSTAKA

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

37(2):127-37.

Anonymous. 2021. Probiotic Recalled Due to Risk of Bacterial Contamination. Terdapat dalam [https://www.consumerlab.com/recalls/14602/probiotic-recalled-due-to-risk-of-bacterial-contamination/POSTED NOVEMBER 2, 2021](https://www.consumerlab.com/recalls/14602/probiotic-recalled-due-to-risk-of-bacterial-contamination/POSTED%20NOVEMBER%202,2021). Diunduh pada tanggal 12 Desember 2022.

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

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

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

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

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

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

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

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

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