

Kontaminasi Fluorokuinolon pada Pakan Ayam Pedaging yang Dikoleksi dari Provinsi Jawa Timur dan Lampung (Contamination of Fluoroquinolones in Broiler Chicken Feed Collected from East Java and Lampung Provinces)

Widiastuti R, Martindah E, Maryam R

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata 30, Bogor 16114

widiastuti.raphaella@gmail.com

ABSTRACT

Fluoroquinolones contamination in broiler feed may cause residue in its products. The objective of the study was to analyze enrofloxacin and ciprofloxacin in 45 chicken feed samples collected from East Java and Lampung Provinces. The chicken feed was extracted using 0.25% formic acid and then purified using a Strata-X cartridge and finally eluted with 0.1% formic acid in acetonitrile. Samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using C18 column and 0.2 M trichloroacetic acid (TCA)-methanol-acetonitrile (74: 4: 22) as the mobile phase under a photo diode array (PDA) detection at 278 nm. The results from HPLC determination showed that ciprofloxacin was detected in 11 (2,44%) with concentration ranged between 2.25-20.42 mg/kg and 4 samples was detected for enrofloxacin with concentration ranged between 0.12-3.16 mg/kg. The presence of fluoroquinolones in chicken feed was probably because these compounds was added as medicated feed or contaminated from feed ingredients which contaminated with these compounds. Therefore, further research is needed to study its correlation to the occurrence of residue in animal products.

Key words: Enrofloxacin, HPLC (high performance liquid chromatography), broiler chicken feed, ciprofloxacin

ABSTRAK

Kontaminasi fluorokuinolon pada pakan ayam menimbulkan residu pada produk yang dihasilkannya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis enrofloksasin dan siprofloksasin pada 45 sampel pakan ayam pedaging yang terdiri atas 21 sampel dari kabupaten Malang dan 9 sampel dari kabupaten Blitar (Provinsi Jawa Timur) serta 9 sampel dari kabupaten Lampung Tengah dan 16 sampel dari kabupaten Lampung Timur (Provinsi Lampung). Pakan ayam diekstraksi menggunakan pelarut 0,25% asam format dan dimurnikan dengan *Strata-X cartridge*, kemudian dielusi dengan 0,1% asam format dalam asetoneitril. Sampel dianalisis secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menggunakan kolom C18 dengan fasa gerak campuran 0,2 M asam trikloroasetat (TCA)-metanol-asetoneitril (74:4:22) dan dideteksi menggunakan detektor *photo diode array (PDA)* pada panjang gelombang 278 nm. Hasil pengujian secara KCKT

memperlihatkan bahwa 11 sampel (24,44%) terdeteksi siprofloksasin dengan kisaran konsentrasi 2,25-20,42 mg/kg dan 4 (8,88%) sampel terdeteksi enrofloksasin dengan kisaran konsentrasi 0,12-3,16 mg/kg. Keberadaan fluorokuinolon pada pakan kemungkinan karena senyawa tersebut ditambahkan sebagai *medicated feed* atau bersumber dari bahan baku pakan yang tercemar senyawa tersebut. Oleh karenanya, diperlukan penelitian untuk melihat korelasinya terhadap residu yang terbentuk pada produk hewani.

Kata kunci: Enrofloksasin, KCKT (kromatografi cair kinerja tinggi), pakan ayam pedaging, siprofloksasin

PENDAHULUAN

Penambahan antibiotika pada pakan ternak, terutama pakan unggas, bertujuan sebagai pemacu pertumbuhan, atau *antibiotic growth promoter* (AGP) (Love et al. 2012)) atau sebagai *medicated feed* (Galarini et al. 2009), sudah lama dilakukan oleh peternak, bukan hanya di Indonesia tetapi juga di seluruh dunia. Enrofloksasin dan siprofloksasin merupakan jenis antibiotika golongan fluorokuinolon yang digunakan dalam pengobatan infeksi mikoplasma, kolibaktilosis, pasteurelosis serta penyakit pernafasan (Šandor et al. 2012) serta salmonellosis pada manusia maupun hewan (Li et al. 2017). Adapun dosis rekomendasi untuk penggunaan enrofloksasin pada ayam adalah 10 mg/kg BB selama 3-5 hari (EMEA 1998) untuk siprofloksasin adalah 1 mg/mL hingga 1 mg/15 ml dalam air minum selama 12-15 hari (Khan et al. 2015).

Enrofloksasin yang diberikan pada ternak akan dimetabolisme oleh hati dan diubah menjadi metabolit utama, yaitu siprofloksasin dan beberapa metabolit minor antara lain oksosiprofloksasin, enrofloksasin amida, dioksosiprofloksasin, oksoenrofloksasin, dan dihidroksienrofloksasin (EMEA 1998). Residu enrofloksasin terbentuk karena penggunaan yang berlebihan atau tidak memperhatikan waktu henti. Residu enrofloksasin dilaporkan ditemukan pada daging ayam (Er et al. 2013) maupun telur (Gbylik-Sikorska et al. 2013). Residu enrofloksasin dan siprofloksasin juga ditemukan pada barley, timun, dan selada (*lettuce*) (Lillenberg et al. 2010)) ataupun bulu (*feather*) yang digunakan sebagai sumber protein (Marchetti et al. 2019). Keberadaan residu enrofloksasin dalam produk pangan asal hewan perlu mendapat perhatian, mengingat enrofloksasin di Amerika Serikat terbukti meningkatkan terjadinya resistensi pada pengobatan terhadap infeksi yang disebabkan oleh *Campylobacter* (Gouvêa et al. 2015). Oleh karena itu, *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat melarang penggunaannya dalam industri perunggasan sejak Juli 2005.

Pada tahun 2017, saat penelitian ini dilaksanakan, belum ada pelarangan penggunaan obat hewan terhadap ternak yang produknya untuk dikonsumsi manusia, sebagaimana tertuang dalam Permentan 14/2017 tentang klasifikasi obat hewan, sehingga tidak menutup kemungkinan obat hewan fluoroquinolon

digunakan secara tidak semestinya. Keberadaan residu enrofloksasin dan siprofloksasin pada produk ternak pernah dilaporkan di Indonesia oleh Widiastuti et al. (2004). Oleh karenanya, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kontaminan fluorokuinolon yang terdiri atas enrofloksasin dan siprofloksasin pada pakan ayam pedaging yang dikoleksi di Kabupaten Malang dan Blitar (Provinsi Jawa Timur) dan Kabupaten Lampung Tengah dan Lampung Timur (Provinsi Lampung) menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang tersedia.

MATERI DAN METODE

Materi

Standar enrofloksasin dan siprofloksasin dengan kemurnian tinggi (~98%, *HPLC grade*) diperoleh dari Vetranal (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Semua reagen dan pelarut yang digunakan adalah *analytical* atau *HPLC grade* dan diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany). Air dengan kemurnian sangat tinggi (*ultra pure water*) dihasilkan dari Milli Q Direct 8/16 System (Millipore SAS, 67120 Molsheim, France). *Cartridge Strata-X (polymeric sorbent-surface modified styrene divinylbenzene, 200 mg, 3 ml)* dari Phenomenex (USA). gas nitrogen dihasilkan dari nitrogen generator (Claind, Leino-Italy).

Pengumpulan sampel

Sebanyak 45 sampel pakan ayam pedaging (*broiler*) yang terdiri atas 21 sampel dari kabupaten Malang dan 9 sampel dari kabupaten Blitar (Provinsi Jawa Timur), serta 9 sampel dari kabupaten Lampung Timur dan 16 sampel dari kabupaten Lampung Tengah (Provinsi Lampung). Sampel dikumpulkan dari peternak di Provinsi Jawa Timur pada bulan April 2017 dan Provinsi Lampung pada bulan Agustus 2017.

Analisis enrofloksasin dan siprofloksasin pada pakan

Metode ekstraksi enrofloksasin pada pakan diadopsi dari metode yang dikembangkan oleh (Gbylik et al. 2012). Sebanyak 1 g sampel pakan yang telah dihomogenkan ditambah dengan 30 ml asam format 0,25% dan kemudian divortex selama 2 menit, disonikasi selama 15 menit dan kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 4500 rpm (5°C). Selanjutnya 5 ml sampel dimurnikan dengan Strata-X cartridge (yang telah dikondisikan dengan 5 ml methanol dan 5 ml akuades), kemudian sampel dicuci dengan 5 ml air dan dikeringkan dengan vakum selama 10 menit. Selanjutnya ekstrak dielusi 2 kali dengan 3 ml 0,1% asam format dalam asetonitril (0,1:99,9, v/v) dan dikeringkan dengan nitrogen pada 45°C.

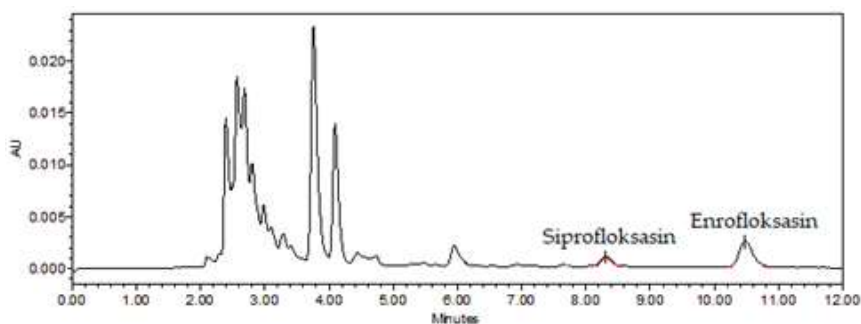
Residu siap dianalisis dengan KCKT Waters Alliance e-2965 (Waters, Millford, USA) yang dilengkapi dengan kolom X-bridge C18 5 μ m (46 \times 15 mm) (Waters, Milford-USA), menggunakan fasa gerak campuran 0,2 M trichloroacetic acid (TCA)-methanol-acetonitrile (74 : 4 : 22) yang disaring melalui 0,45 μ m PVDF filter (Whatman, Maidstone, UK) secara isokratik pada kecepatan alir 1,0 ml/menit dan dideteksi dengan detector *photo diode array* (PDA) pada panjang gelombang 278 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi metode deteksi

Pakan merupakan matrik yang cukup sulit dianalisis secara KCKT karena banyaknya campuran dalam pakan berupa protein, pewarna, lemak, minyak nabati, yang merupakan pengotor yang mengganggu pada saat dianalisis (Gbyblik et al. 2012). Kromatogram pemisahan siprofloksasin dan enrofloksasin yang dideteksi menggunakan detektor PDA pada penelitian ini memperlihatkan pemisahan yang baik dengan waktu retensi (Rt) berturut-turut 8,10 menit dan 10,24 menit (Gambar 1).

Adapun hasil uji perolehan kembali serta batas deteksi dan batas kuantitasi siprofloksasin dan enrofloksasin dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil uji perolehan kembali yang didapat pada penelitian ini mendekati yang diperoleh Gbylik et al. (2012), yaitu pada kisaran 59-70% namun lebih rendah dibandingkan yang diperoleh Galarini et al. (2009) pada kisaran 74-81%. Sedangkan limit deteksi dan limit kuantitasi hampir setara dengan yang diperoleh Gbylik et al. (2012) dengan batas deteksi siprofloksasin 0,024 mg/kg dan batas kuantitasi siprofloksasin 0,045 mg/kg, sedangkan batas deteksi enrofloksasin 0,022 mg/kg dan batas kuantitasi enrofloksasin 0,051



Gambar 1. Kromatogram pemisahan siprofloksasin (Rt = 8,10 menit) dan enrofloksasin (Rt = 10,23 menit) dalam sampel pakan

Tabel 1. Hasil uji perolehan kembali dan batas deteksi/batas kuantitasi pengujian enrofloksasin dan siprofloksasin dalam sampel

Parameter	Siprofloksasin	Enrofloksasin
Uji perolehan kembali (%)	59,47	76,77
Batas deteksi (mg/kg)	0,041	0,032
Batas kuantitasi (mg/kg)	0,060	0,045

mg/kg, namun jauh lebih sensitif dibandingkan dengan yang diperoleh Galarini et al. (2009) dengan batas deteksi siprofloksasin 0,2 mg/kg dan batas kuantitasi siprofloksasin 0,5 mg/kg dan batas deteksi enrofloksasin 0,2 mg/kg dan batas kuantitasi enrofloksasin 0,4 mg/kg yang mana pada kedua penelitian tersebut menggunakan detektor fluoresen.

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa pendeteksian dapat juga menggunakan detektor PDA dan pemisahan dilakukan secara isokratik yang lebih mudah dibandingkan gradien, namun kurang sensitif dibandingkan penggunaan detektor fluoresen. Hasil yang diperoleh tersebut cukup baik untuk diaplikasikan dalam mendeteksi 45 sampel yang diperoleh dari berbagai lokasi di lapang.

Kontaminasi enrofloksasin dan siprofloksasin pada pakan

Hasil analisis keberadaan enrofloksasin pada 45 pakan yang berasal dari Kabupaten Malang dan Blitar (Provinsi Jawa Timur) serta Kabupaten Lampung Timur dan Lampung Tengah (Provinsi Lampung) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Residu siprofloksasin dan enrofloksasin pada sampel pakan ayam pedaging dari Provinsi Jawa Timur dan Provinsi Lampung

Lokasi	Jumlah sampel	Siprofloksasin			Enrofloksasin	
		Jumlah sampel positif	Konsentrasi (mg/kg)	Jumlah sampel ≥ 10 mg/kg	Jumlah sampel positif	Konsentrasi (mg/kg)
Malang	21	1	18,92	1	TT	-
Blitar	9	7	3,11-20,19	5	2	0,12 dan 0,23
Lampung Tengah	9	4	2,25-15,28	1	TT	-
Lampung Timur	16	3	5,2-14,59	1	2	1,31 dan 3,16
Total	45	11	2,25-18,92	8	4	0,12 dan 3,16

TT = tidak terdeteksi

Pada sampel pakan asal Kabupaten Malang (n = 21) ditemukan 1 sampel terdeteksi siprofloksasin dengan konsentrasi 18,92 mg/kg dan pada sampel asal Kabupaten Blitar (n = 9) ditemukan 7 sampel terdeteksi adanya siprofloksasin dengan kisaran konsentrasi 3,11-19,35 mg/kg. Sedangkan sampel pakan asal Kabupaten Lampung Tengah (n = 9) ditemukan 4 sampel terdeteksi enrofloksasin dengan kisaran konsentrasi 2,25-15,28 mg/kg dan 5 sampel asal Kabupaten Lampung Timur (n = 9) terdeteksi enrofloksasin dengan kisaran 1,31-14,59 mg/kg. Secara keseluruhan disimpulkan bahwa 11 dari 45 (24,44%) sampel pakan mengandung siprofloksasin pada kisaran konsentrasi 2,25-20,42 mg/kg dan 8 diantaranya di atas 10 mg/kg, serta 4 (8,88%) sampel mengandung enrofloksasin pada kisaran 0,12-3,16 mg/kg.

Keberadaan kontaminan siprofloksasin dan enrofloksasin tersebut kemungkinan karena ditambahkan ke dalam pakan untuk tujuan sebagai *medicated feed* (Galarini et al. 2009), atau berasal dari bahan penyusun pakan seperti bulu ataupun jagung yang mengandung kontaminan fluorokuinolon, sehingga bila air minum juga diberi antibiotika ini, maka konsentrasi antibiotika yang masuk ke dalam tubuh ternak menjadi berlebih. Bulu (*feather*) merupakan sumber protein namun sekaligus merupakan sumber masuknya enrofloksasin beserta siprofloksasin (metabolitnya) ke dalam rantai pakan (Kumar et al. 2014). Sedangkan kontaminasi fluorokuinolon di dalam jagung berasal dari manur (Frade et al. 2014) ataupun air irigasi yang terkontaminasi fluorokuinolon (Gomes et al. 2020).

Penggunaan enrofloksasin sebagai *medicated feed* sangat perlu untuk diperhatikan, karena enrofloksasin merupakan antibakteri yang mempunyai aktivitas bergantung kepada konsentrasi yang diberikan (*concentration-dependent*) (Li et al. 2017). Pada penelitian pemberian enrofloksasin selama 7 hari pada dosis rendah (0,1 mg/kg bb) tidak menyebabkan penurunan total coliform, pada dosis rekomendasi (10 mg/kg bb) menyebabkan *S. typhimurium* tertekan hingga berada di bawah batas deteksi pada 7 hari pertama perlakuan dan setelah penghentian meningkat kembali dan sekitar 5-9,5% muncul coliform yang resisten di hari ke-39-42, sedangkan pada dosis tinggi (100 mg/kg bb) *coliform* menghilang dengan sangat cepat pada 7 hari perlakuan namun kembali pada 4-7 hari di masa hentinya dan 66-95% coliform muncul pada hari ke-3-42 dan 60% diantaranya resisten. Oleh karenanya, keberadaan kontaminasi ini perlu mendapat perhatian dan dipelajari untuk dilihat korelasinya terhadap kejadian terbentuknya residu pada produk ternak (daging, susu ataupun telur).

KESIMPULAN

Hasil analisis terhadap 45 sampel pakan asal kabupaten Malang dan Blitar (Provinsi Jawa Timur) serta Kabupaten Lampung Tengah dan Lampung Timur (Provinsi Lampung) memperlihatkan 11 (24,44%) sampel di antaranya terdeteksi siprofloksasin dengan kisaran 2,25-20,42 mg/kg dan 4 sampel terdeteksi

enrofloksasin dengan kisaran 0,12-3,16 mg/kg. Terdeteksinya fluorokuinolon (enrofloksasin dan siprofloksasin) pada pakan kemungkinan karena senyawa tersebut ditambahkan sebagai *medicated feed* atau berasal dari bahan penyusun pakan (jagung, bulu) yang tercemar senyawa tersebut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Badan Litbang Pertanian, Kementerian Pertanian pada Tahun Anggaran 2017 (No. Proyek 1806.022.052P). Penelitian ini juga didukung oleh Kepala Dinas beserta staf yang mendampingi pengambilan sampel lapang dari Dinas Pertanian/Peternakan dari Kabupaten Malang, Kabupaten Blitar, kabupaten Lampung Tengah, dan Kabupaten Lampung Timur. Ucapan terimakasih juga ditujukan kepada Sdr. R. Firmansyah, Sdr. Tatang Tarmidi, dan Sdr. Miharja, teknisi Laboratorium Toksikologi Balai Besar Penelitian Veteriner yang membantu menganalisis sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- EMEA. 1998. Enrofloxacin (Modification for bovine, porcine and poultry). (July):1-6.
- Er B, Kaynak Onurdã F, Demirhan B, Özgen Özgacar S, Bayhan Öktem A, Abbasođlu U. 2013. Screening of quinolone antibiotic residues in chicken meat and beef sold in the markets of Ankara, Turkey. *Poult Sci.* 92:2212-2215.
- Frade VMF, Dias M, Teixeira ACSC, Palma MSA. 2014. Environmental contamination by fluoroquinolones. *Brazilian J Pharm Sci.* 50(1):41-54.
- Galarini R, Fioroni L, Angelucci F, Tovo GR, Cristofani E. 2009. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A.* 1216:8158-8164.
- Gbylik-Sikorska M, Posyniak A, Gajda A, Bładek T. 2013. Determinaton of enrofloxacin and ciprofloxacin in albumin and freeze-dried-eggs by liquid chromatography with fluorescence detection. *Bull Vet Inst Pulawy.* 57:351-355.
- Gbylik M, Posyniak A, Gajda A. 2012. Simultaneous determinaton of fluoroquinolones in feed by liquid chromatography with fluorescence detection. *Bull Vet Inst Pulawy.* 56:343-347.
- Gouvêa R, Dos Santos FF, De Aquino M, Pereira VL A. 2015. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: A Review. *Rev Bras Cienc Avic.* 17:1-10.
- Khan GJ, Majeed I, Khan S. 2015. Ciprofloxacin; The frequent use in poultry and its consequences. *Prof Med J.* 22:1-5.
- Kumar VS, Chandra GS, Ramesh J, Vairamuthu S, Thejomoorthy P, Hariharan P. 2014. Feather - a potential source for reentry of enrofloxacin and its metabolite

- ciprofloxacin residues in food chain. *Indian J Vet Anim Sci Res* [Internet]. 10(2):151–155. [http://www.tanuvas.ac.in/tnjvas/tnjvas/vol43\(2\)/151-155.pdf](http://www.tanuvas.ac.in/tnjvas/tnjvas/vol43(2)/151-155.pdf)
- Li J, Hao H, Cheng G, Wang X, Ahmed S, Shabbir MAB, Liu Z, Dai M, Yuan Z. 2017. The effects of different enrofloxacin dosages on clinical efficacy and resistance development in chickens experimentally infected with *Salmonella Typhimurium*. *Sci Rep*. 7:1-12.
- Lillenberg M, Litvin S, Nei L, Rasto M, Sepp K. 2010. Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil. *Agron Res*. 8:807-814.
- Love DC, Halden RU, Davis MF, Nachman KE. 2012. Erratum: Feather meal: A previously unrecognized route for reentry into the food supply of multiple Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) (*Environmental Science and Technology* (2012) 46 (3795-3802) DOI:10.1021/es203970e). *Environ Sci Technol*. 46:5631.
- Marchetti ML, Buchamer A, Buldain D, Mestorino N. 2019. Enrofloxacin and ciprofloxacin residues in broiler chicken feathers after enrofloxacin oral administration. *Ec Vet Sci*. 4:180-186.
- Pedrosa M, Cristina D, César J, Brito M De, Francisco B, Anna-santos S, Fisiologia L De, Plantas D. 2020. Ecotoxicology and Environmental Safety Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 196(March):110549. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110549>
- Šandor K, Svjetlana T, Andrišić M, Žarković I, Eleonora P. 2012. In-use stability of enrofloxacin solution for injection in multi-dose containers. *Acta Vet Brno*. 62(2–3):213-225.
- Widiastuti R, Yuningsih, Murdiati, TB. 2004. Residu enrofloksasin pada daging dan hati ayam ras pedaging. Dalam: Thalib A, Sendow I, Purwadaria T, Tarmudji, Darmono, Triwulanningsih E, Beriajaja, Natalia L, Nurhayati, Ketaren PP, et al., penyunting. *IPTEK sebagai Motor Penggerak Pembangunan Sistem dan Usaha Agribisnis Peternakan*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus 2004. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 515-518.

DISKUSI

Pertanyaan

1. *Apakah pemakaian growth promotor seperti chitosan diperbolehkan/diizinkan?*
2. *Mengapa uji perolehan kembali nilainya rendah?*

Jawaban

1. *Yang boleh digunakan untuk growth promotor adalah senyawa alami non toksik (yang tidak termasuk dalam senyawa/bahan yang dilarang (Permentan 14/2017)*

- 2. Hasil uji perolehan kembali bernilai rendah karena terdapat matrik penyusun pakan (lemak, protein tinggi) yang dapat mengganggu pemisahan senyawa target*