

# Resistensi *Escherichia coli* terhadap Kolistin dan Deteksi Gen *Mobilized Colistin Resistance-1* pada Ayam Pedaging Akibat Pemberian Kolistin Sulfat

(*ESCHERICHIA COLI COLISTIN RESISTANCE AND DETECTION OF MOBILIZED COLISTIN RESISTANCE-1 GENE IN COLISTIN SULPHATE TREATMENT BROILERS*)

Maria Fatima Palupi<sup>1</sup>, Hera Maheshwari<sup>2</sup>, Huda Salahuddin Darusman<sup>2,4</sup>,  
Etih Sudarnika<sup>3</sup>, I Wayan Teguh Wibawan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan,  
Kementerian Pertanian Republik Indonesia  
Jl. Raya Pembangunan Gunungsindur, Bogor, Jawa Barat 16340

<sup>2</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi

<sup>3</sup>Departemen Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor  
Jalan Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor,  
Jawa Barat, Indonesia 16680

<sup>4</sup>Pusat Studi Satwa Primata,  
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat IPB  
Jl. Lodaya II No. 5 Bogor, Jawa Barat 6128  
Email: lupi\_ima@yahoo.co.id

## ABSTRAK

Kolistin sulfat merupakan obat pilihan terakhir dalam menangani infeksi bakteri Gram negatif multiresistan pada manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui resistansi *Escherichia coli* terhadap kolistin pada ayam pedaging yang diberi kolistin sulfat, mendeteksi gen *Mobilized Colistin Resistance-1 (mcr-1)*, dan mentransfer gen *mcr-1* dari *E. coli* resistan kolistin ke *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Sebanyak 54 ekor ayam pedaging umur satu hari dibagi menjadi tiga kelompok yang masing-masing terdiri dari 18 ekor dan dipelihara selama 40 hari. Kelompok pertama adalah kontrol, kelompok perlakuan pertama diberi kolistin sulfat dosis 5 µg/g pakan selama 40 hari, dan perlakuan kedua diberikan kolistin sulfat 80.000 iu/kg BB selama 3 hari pertama. Tiap 10 hari dilakukan pengambilan apus kloaka dan pada akhir perlakuan semua ayam pedaging tersebut dikorbankan nyawanya untuk diambil sampel dagingnya. Sampel apus kloaka, daging mentah, dan daging matang diuji terhadap ada tidaknya *E. coli* resistan kolistin dan gen *mcr-1*. Uji resistansi kolistin dilakukan dengan metode *agar dilution*, dan deteksi gen *mcr-1* dilakukan dengan *polymerase chain reaction*, dan analisis data dilakukan secara deskriptif. Pada kelompok kontrol tidak ditemukan *E. coli* resistan kolistin. Sebanyak 27,78% ayam pedaging yang diberi kolistin sulfat dosis 5 µg/g pakan memiliki *E. coli* resistan kolistin dan 20% memiliki gen *mcr-1*. Sebanyak 11,11% ayam pedaging yang diberi kolistin sulfat dosis 80.000 iu/kg BB memiliki *E. coli* resistan kolistin dan 5,56% membawa gen *mcr-1*. Bakteri *E. coli* dari daging mentah didapatkan 5,56% resistan kolistin dan 3,70% memiliki gen *mcr-1*. Gen *mcr-1 E. coli* resistan kolistin donor berhasil dipindahkan ke *S. enteritidis* ATCC 13076. Hasil penelitian menunjukkan pentingnya pembatasan penggunaan kolistin sulfat pada hewan produksi.

Kata-kata kunci: resistansi; kolistin sulfat; *Escherichia coli*; *mcr-1*; ayam pedaging

## ABSTRACT

Colistin sulphate is the ultimate antimicrobial choice for the treatment of multidrug resistance gram negative bacteria infections with in human. The purposes of this study were to detect the presence of colistin resistant *E. coli* and *mcr-1* gene in broiler and to transfer the *mcr-1* gene to *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. A total of 54 one day old broilers were divided into three groups that consists of 18 chicks broiler per group and raised up to 40 days old. The first group was used as control. The first treatment group was given colistin sulphate 5 ig/g feed for 40 days and broilers in second treatment group was given

80.000 IU/kg body weight for first three days. Swab cloaca samples were taken every 10 days from each broiler. At age 40 days all chickens were slaughtered and meat samples were collected. Samples of cloacal swabs, fresh and cooked meat were examined for the presence of colistin resistant *E. coli* and *mcr-1* gene. Susceptibility to colistin sulfate was conducted by agar dilution method, and detection of *mcr-1* gene was conducted using polymerase chain reaction. The results showed that no colistin resistant *E. coli* was detected in the control group. Colistin resistant *E. coli* (27.78%) and *mcr-1* gene (20.00%) were detected in animals in the first treatment group, respectively. Whilst 11.11% colistin resistant *E. coli* and 5.56% were carrying *mcr-1* gene in the second treatment group. Colistin resistant *E. coli* were found 5.56% from raw meat samples and 3.70% had *mcr-1* gene. Transfer of *mcr-1* gene from colistin resistant *E. coli* to *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 was success. These results showed the necessity of limitation usage of colistin sulphate in food animal.

Keywords: resistance; colistin sulphate; *Escherichia coli*; *mcr-1* gene; broilers.

## PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan salah satu penemuan terpenting pada abad ke-20 dan mempunyai peranan sangat penting dalam mengurangi kerugian akibat penyakit infeksi pada manusia dan ternak (Li *et al.*, 2006). Tonggak penting penemuan antibiotik dimulai sejak Alexander Flemming menemukan penisilin pada tahun 1928. Penemuan berbagai antimikrob kemudian berkembang pesat, akan tetapi sejak tahun 1980 perkembangan tersebut menurun (Ventola, 2016). Penurunan penemuan antimikrob baru diiringi dengan peningkatan resistansi bakteri yang semakin meningkat. Resistansi antimikrob pada tahun 2050 diperkirakan akan menyebabkan peningkatan kematian hingga 10 juta orang/tahun dan kerugian ekonomi global mencapai 100 trilyun dolar Amerika Serikat (Grace, 2015).

Sejak digunakan pada manusia, antimikrob juga digunakan pada hewan produksi. Antimikrob khususnya antibiotik, pada hewan produksi digunakan sebagai terapi, pencegahan penyakit, dan juga digunakan sebagai pemacu pertumbuhan (Ventola, 2016). Hewan produksi beserta lingkungan produksinya dianggap sebagai salah satu reservoir bakteri resistan yang dapat berpindah ke manusia baik secara langsung ataupun tidak langsung (Marshal dan Levy, 2011; WHO, 2016). Penggunaan jenis antimikrob yang sama pada manusia dan hewan merupakan salah satu faktor adanya perpindahan bakteri yang resistan terhadap antimikrob yang sama pada hewan atau produk hewan ke manusia (Filho *et al.*, 2015). Salah satu antimikrob yang digunakan pada manusia dan hewan adalah kolistin sulfat.

Kolistin sulfat merupakan antimikrob golongan polimiksin yang ditemukan pada tahun 1949 (Morales *et al.*, 2012). Kolistin sulfat

bersifat nefrotoksik dan neurotoksik, sehingga sejak tahun 1980an kolistin sulfat tidak banyak lagi digunakan pada manusia (Falagas dan Kasiakou, 2005). Dalam dunia kesehatan hewan, kolistin sulfat telah digunakan beberapa dekade untuk pengobatan maupun pencegahan penyakit infeksi pada babi, pedet, unggas, serta dapat digunakan sebagai pemacu pertumbuhan pada ayam pedaging (Bozorgmehri, 2004; Catry *et al.*, 2015).

Kolistin sulfat merupakan salah satu antibiotik dalam daftar *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* (WHO 2011). Kolistin sulfat digunakan sebagai pilihan obat terakhir untuk pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif multiresistan seperti *Acinetobacter species*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacteriaceae* multiresistan karbapenemase (Falagas dan Kasiaku, 2005; Collignon *et al.*, 2009; Catry *et al.*, 2015; Nordmann *et al.*, 2016).

*Escherichia coli* merupakan bakteri yang digunakan untuk pemantauan dan surveilans resistansi antimikrob (OIE, 2016). Adanya gen *mobilized colistin resistance (mcr)-1* pada plasmid *E. coli* yang ditemukan pada sampel dari hewan dan manusia oleh Liu *et al.* (2015) memicu kekhawatiran global akan keberlanjutan penanganan kasus infeksi bakteri Gram negatif multiresistan pada manusia. Gen *mcr-1* juga telah ditemukan pada bakteri selain *E. coli*, akan tetapi hingga sekarang *E. coli* merupakan pembawa utama gen *mcr-1* (Yi *et al.*, 2017).

Gen *mcr-1* merupakan gen resistan kolistin yang pertama kali diketahui mampu ditransfer secara horizontal atau melalui konjugasi antarspesies bakteri (Liu *et al.*, 2015). Kurang dari satu tahun setelah dipublikasikan, gen ini telah terdeteksi pada sampel yang berasal dari manusia dan hewan beserta produknya di lebih

dari 30 negara dari lima benua (Schwarz dan Johnson, 2016). Adapun penelitian mengenai resistansi kolistin sulfat di Indonesia sangat kurang dan belum dilakukan pemantauan dan surveilans terhadap gen *mcr-1*. Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat resistansi *E. coli* komensal terhadap kolistin, mendeteksi gen *mcr-1* pada *E. coli* resistan kolistin dari ayam pedaging dan produknya setelah pemberian kolistin sulfat, dan melakukan transfer gen *mcr-1* melalui konjugasi dari *E. coli* resistan kolistin ke *S. enteritidis* ATCC 13076 yang peka terhadap kolistin.

## METODE PENELITIAN

### Perlakuan Hewan Coba

Penelitian dilakukan di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH). Penggunaan dan perlakuan terhadap hewan coba telah disetujui Komisi Etik Hewan Percobaan BBPMSOH dengan nomor surat 02/LB040/10/2016. Hewan coba yang digunakan adalah 54 ekor ayam pedaging umur satu hari *strain* Cobb yang dibagi menjadi tiga kelompok masing-masing 18 ekor dan dipelihara selama 40 hari.

Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol dan selama pemeliharaan tidak diberi kolistin sulfat baik dalam pakan maupun air minum. Kelompok perlakuan selanjutnya adalah ayam pedaging yang diberi kolistin sulfat *feed grade* komersial dalam pakan dengan konsentrasi 5 µg/g pakan. Kelompok perlakuan kedua diberi kolistin sulfat 80.000 iu/kg bobot badan (BB) selama tiga hari pada umur 1-3 hari dan pakan bebas antimikrob.

Semua ayam pedaging diambil apus kloaka pada umur 1, 10, 20, 30, dan 40 hari untuk dilakukan isolasi *E. coli* dan uji kepekaan *E. coli* terhadap kolistin. Ayam pedaging yang memiliki isolat *E. coli* resistan kolistin tidak diambil lagi apus kloaka pada pengambilan periode selanjutnya. Pada saat umur 40 hari, semua ayam pedaging dibawa ke satu Rumah Potongang Unggas Skala Kecil (RPUSK) dan masing-masing diambil daging bagian paha dan sekitar kloaka. Sampel daging dibagi menjadi dua, yaitu untuk pemeriksaan adanya *E. coli* pada saat mentah dan setelah matang dengan cara direbus pada air mendidih selama 30 menit. Semua sampel dilakukan uji isolasi *E. coli* dan uji resistansi terhadap kolistin sulfat.

### Isolasi *E. coli*

Sampel apus kloaka langsung diusapkan ke agar MacConkey (MCA) (Oxoid-UK) atau *levine-eosin methylene blue* (L-EMBA) (Oxoid-UK) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sampel daging mentah dan daging matang ditimbang 10 g dan dimasukkan ke dalam 90 mL *buffer phosphate water* (BPW) 0,1% kemudian dimasukkan ke dalam *stomacher*. Sebanyak 1 mL dari tiap larutan BPW 0.1% diambil dan dimasukkan ke dalam 9 mL *lauryl sulphate tryptose broth* (LSTB) (Oxoid-UK), kemudian diinkubasi pada 35°C selama 24-48 jam. Larutan LSTB yang telah diinkubasi diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam 9 mL media EC (DB/Difco-FRA), kemudian diinkubasi pada suhu 45,5°C selama 24-48 jam. Pertumbuhan bakteri pada media LSTB dan EC ditandai dengan perubahan media dari jernih menjadi keruh. Satu *loop ose* dari media EC kemudian diusapkan pada MCA atau L-EMBA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Masing-masing sampel diambil satu koloni yang diduga *E. coli*. Koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan cara menanamkannya kembali pada media MCA atau L-EMBA. Semua isolat *E. coli* dikonfirmasi menggunakan uji biokimia atau uji IMViC: *sulfite indole motility* (Indole) (Oxoid-UK), *metil red-voges proskauer* (MR-VP) (Oxoid-UK), dan sitrat (Oxoid-UK). Isolat *E. coli* yang digunakan untuk uji berikutnya adalah isolat yang memberikan hasil tes ImVic: Indole (+), MR (+), VP (-), dan sitrat (-) (SNI 2008).

### Uji Resistansi *E. coli* Terhadap Kolistin Sulfat

Penentuan resistansi *E. coli* terhadap kolistin sulfat dilakukan dengan menggunakan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dengan metode *agar dilution* (Bahera *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2012; Dafopoulou *et al.*, 2015). Media yang digunakan adalah agar Muller Hinton (MHA, Difco/DB-FRA) yang mengandung standar kolistin sulfat (Sigma-USA) dengan konsentrasi kelipatan dua dimulai dari 0,125 µg/mL hingga 16 µg/mL. *Escherichia coli* ATCC 25922 digunakan sebagai kontrol (CLSI, 2016). Bakteri *E. coli* dinyatakan resistan jika nilai KHM > 2 µg/mL (Morales *et al.*, 2012; BSAC 2016; EUCAST, 2017)

### Deteksi dan Transfer Gen *mcr-1*

Metode deteksi gen *mcr-1* pada *E. coli* resistan kolistin dilakukan dengan menggu-

nakan *polymerase chain reaction* (PCR) berdasarkan metode Liu *et al.* (2015) dan Cavaco *et al.* (2016) dengan beberapa modifikasi. Ekstraksi DNA dilakukan dengan memasukkan satu *loop* ose isolat *E. coli* ke dalam 100  $\mu$ L reagen persiapan sampel PrepMan™ Ultra (Life-USA) kemudian direbus dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit. Komposisi *master mix* untuk 25  $\mu$ L reaksi terdiri dari 12,5  $\mu$ L Hotstart *master mix* (Qiagen-DEU), 1  $\mu$ L (5  $\mu$ M) primer *mcr-1* CLR-F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3'), 1  $\mu$ L (5  $\mu$ M) primer *mcr-1* CLR-R (5'-CTTGGTCCGGTCTGTAGGG-3'), DNA *template* 5  $\mu$ L (10x), dan H<sub>2</sub>O (Qiagen-DEU) sampai dengan 25  $\mu$ L. Kondisi *thermocycler* PCR adalah sebagai berikut: 94°C 15 menit + 25x (94°C 30 detik + 57,5°C 90 detik + 72°C 60 detik) + 72°C 10 menit. Amplikon PCR diuji dengan menggunakan elektroforesis dan visualisasi UV menggunakan agarose 1,5% (Life-USA). Bakteri *E. coli* resistan kolistin dinyatakan memiliki gen *mcr-1* apabila muncul pita pada amplikon 309 bp.

Metode uji transfer gen resistan melalui konjugasi plasmid dikembangkan dari Sumadi *et al.* (1999). Bakteri *E. coli* donor adalah *E. coli* resistan kolistin sulfat (kode isolat DI15). Bakteri resipien adalah *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 yang peka terhadap kolistin sulfat. Tiap donor dan resipien dibiakkan dalam *heart infusion broth* (DB/Difco-FRA) selama enam jam pada suhu 37°C. Sebanyak 1 mL biakan donor dan 0,1 mL biakan resipien dicampur dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Campuran biakan kemudian ditanam pada agar *Deoxycholate-hydrogen sulfides-lactoes* (DHL, Difco/DB-FRA) yang mengandung 2  $\mu$ g/mL kolistin sulfat. Media DHL yang telah diinokulasi diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Koloni *S. enteritidis* ATCC 13076 yang mampu tumbuh kemudian dimurnikan pada media *Rapid Salmonella* (Bio Rad-FRA) dan diuji resistansinya terhadap kolistin sulfat dengan menggunakan metode *agar dilution*. Uji konfirmasi identitas *S. enteritidis* ATCC 13076 resistan kolistin dilakukan dengan uji PCR sebagaimana Alvares *et al.* (2004) dengan menggunakan primer *S. enteritidis* ENTF (5'-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3') dan primer ENTR (5'-TGAACACTACGTTTCGTTCTTCTGG-3'). Komposisi *master mix* untuk 25  $\mu$ L reaksi terdiri dari 12,5  $\mu$ L Hotstart *master mix* (Qiagen-DEU), 1  $\mu$ L primer ENTF (20  $\mu$ M), 1  $\mu$ L primer ENTR (20  $\mu$ M), DNA *template* 5  $\mu$ L (100x), dan H<sub>2</sub>O (Qiagen-DEU) sampai dengan

25  $\mu$ L. Kondisi *thermocycler* PCR adalah sebagai berikut: 94°C 15 menit + 30x (94°C 60 detik + 57,5°C 60 detik + 72°C 60 detik) + 72°C 10 menit. Amplikon PCR diuji dengan menggunakan elektroforesis dan visualisasi UV dengan menggunakan agarose 1,5% dan panjang amplikon adalah 304 bp. Uji gen *mcr-1* pada *S. enteritidis* ATCC 13076 resistan kolistin dilakukan dengan uji PCR sebagaimana uji deteksi PCR gen *mcr-1* pada *E. coli*, dengan konsentrasi DNA *template* 100 kali.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Resistensi *Escherichia coli* Terhadap Kolistin Sulfat

Berdasarkan hasil rekapitulasi nilai KHM kolistin sulfat terhadap *E. coli* sebagaimana yang disajikan dalam Tabel 1-3, didapatkan isolat *E. coli* pada saat ayam pedaging umur satu hari hanya ditemukan pada tiga ekor ayam. Adapun dari sampel apus kloaka pada umur 10, 20, 30, 40, dan 54 sampel daging mentah semuanya dapat ditemukan adanya isolat *E. coli*, sedangkan dari 54 sampel daging matang tidak ada satupun ditemukan adanya isolat *E. coli*.

Pengambilan apus kloaka pada saat ayam pedaging berumur satu hari dilakukan segera setelah ayam datang dan belum mengalami perlakuan apapun. Sedikitnya jumlah ayam umur satu hari yang menunjukkan adanya pertumbuhan *E. coli* komensal dimungkinkan karena pertumbuhan *E. coli* komensal pada 51 ekor anak ayam lainnya belum tumbuh dengan baik. Mikroflora intestinal pada ayam pedaging baru berkembang setelah penetasan dan bakteri sering kali tidak terdeteksi pada saat hari pertama menetas. Pertumbuhan bakteri komensal biasanya ditemukan pada saat ayam berumur tiga hari (Barnes *et al.*, 1980; Coloe *et al.*, 1984; Lan *et al.*, 2005). Ketiga ekor ayam umur satu hari yang ditemukan ada isolat *E. coli* berada pada kelompok kontrol (Tabel 1). Berdasarkan hasil uji kepekaan dengan menggunakan nilai KHM sebagaimana terdapat dalam Tabel 1. Tiga isolat yang didapatkan dari ayam umur satu hari tidak ada yang resistan kolistin sulfat karena semuanya memiliki nilai KHM 2  $\mu$ g/mL. Isolat *E. coli* dinyatakan resistan kolistin apabila nilai KHMnya di atas 2  $\mu$ g/mL. Hal ini menunjukkan bahwa pada awalnya semua ayam yang digunakan untuk percobaan tidak membawa *E. coli* resistan kolistin. .

Berdasarkan hasil uji resistansi *E. coli*

Tabel 1. Rekapitulasi nilai konsentrasi hambat minimum kolistin sulfat terhadap *E. coli* dari sampel apus kloaka dan daging kelompok ayam pedaging yang tidak diberi kolistin sulfat

Kode Ayam	Nilai KHM ( $\mu\text{g/mL}$ ) Kolistin Sulfat Terhadap <i>E. coli</i> dari sampel						
	Apus Kloaka Umur					Daging	
	1 hari	10 hari	20 hari	30 hari	40 hari	Mentah	Matang
III1	-	1	1	0.5	1	2	-
III2	-	2	2	0.5	1	1	-
III3	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
III4	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
III5	-	0.5	1	0.5	2	0.5	-
III6	-	2	2	0.5	1	2	-
III7	-	2	0.5	2	2	1	-
III8	-	0.5	1	2	0.5	2	-
III9	-	1	1	1	1	1	-
III10	2	0.5	1	1	0.5	0.5	-
III11	2	2	1	1	1	2	-
III12	2	2	2	1	2	2	-
III13	-	1	0.5	2	2	2	-
III14	-	1	1	2	1	2	-
III15	-	0.5	1	1	1	1	-
III16	-	1	1	1	1	1	-
III17	-	2	1	2	2	2	-
III18	-	1	1	1	2	4*	-

Keterangan: (-) tidak ada isolat *E. coli*; (\*) nilai KHM > 2  $\mu\text{g/mL}$  dinyatakan *E. coli* resistan kolistin

Tabel 2. Rekapitulasi nilai konsentrasi hambat minimum kolistin sulfat terhadap *E. coli* dari sampel apus kloaka dan daging kelompok ayam pedaging yang mendapat dosis 5  $\mu\text{g/g}$  pakan selama 40 hari

Kode Ayam	Nilai KHM ( $\mu\text{g/mL}$ ) Kolistin Sulfat Terhadap <i>E. coli</i> Dari Sampel						
	Apus Kloaka umur					Daging	
	1 hari	10 hari	20 hari	30 hari	40 hari	Mentah	Matang
I1	-	0.5	1	0.5	1	2	-
I2	-	1	4*	TU	TU	2	-
I3	-	1	2	2	2	1	-
I4	-	1	1	1	4*	1	-
I5	-	8*	TU	TU	TU	1	-
I6	-	1	0.5	1	2	2	-
I7	-	1	2	0.5	2	1	-
I8	-	2	2	2	1	2	-
I9	-	1	4*	TU	TU	1	-
I10	-	2	0.5	1	2	1	-
I11	-	1	1	2	1	2	-
I12	-	2	1	2	1	1	-
I13	-	1	1	2	2	1	-
I14	-	1	1	2	2	2	-
I15	-	1	1	2	1	4*	-
I16	-	1	1	2	1	2	-
I17	-	1	1	1	2	2	-
I18	-	0.5	0.5	4*	TU	2	-

Keterangan: (-) tidak ada isolat *E. coli*; (\*) nilai KHM > 2  $\mu\text{g/mL}$  dinyatakan *E. coli* resistan kolistin; (TU = Tidak Uji) tidak dilakukan pengambilan apus kloaka karena sudah dinyatakan resistan pada apus kloaka sebelumnya

Tabel 3. Rekapitulasi nilai konsentrasi hambat minimum kolistin sulfat terhadap *E. coli* dari sampel apus kloaka dan daging kelompok ayam pedaging yang mendapat dosis 80.000 iu/kg bb selama 3 hari pada umur 1-3 hari

Kode Ayam	Nilai KHM ( $\mu\text{g/mL}$ ) Kolistin Sulfat Terhadap <i>E. coli</i> dari sampel						
	Apus Kloaka umur:					Daging	
	1 hari	10 hari	20 hari	30 hari	40 hari	Mentah	Matang
II1	-	1	2	2	2	1	-
II2	-	1	1	1	2	1	-
II3	-	4*	TU	TU	TU	2	-
II4	-	2	2	2	2	2	-
II5	-	1	1	2	2	1	-
II6	-	2	2	2	2	1	-
II7	-	1	1	2	2	0.5	-
II8	-	4*	TU	TU	TU	0.5	-
II9	-	2	1	2	2	2	-
II10	-	2	1	2	2	4*	-
II11	-	1	2	2	1	1	-
II12	-	2	2	2	2	2	-
II13	-	1	2	2	2	1	-
II14	-	2	2	2	2	2	-
II15	-	1	1	2	2	2	-
II16	-	2	2	2	2	2	-
II17	-	0.5	2	2	2	2	-
II18	-	2	2	2	1	2	-

Keterangan: (-) tidak ada isolat *E. coli*; (\*) nilai KHM > 2  $\mu\text{g/mL}$  dinyatakan *E. coli* resistan kolistin; (TU = Tidak Uji) tidak dilakukan pengambilan apus kloaka karena sudah dinyatakan resistan pada pengambilan apus kloaka sebelumnya

terhadap kolistin pada kelompok kontrol, hingga pengambilan usap kloaka yang ke-5 tidak ditemukan adanya isolat *E. coli* resistan kolistin. Semua nilai KHM isolat-isolat *E. coli* yang didapat dari sampel apus kloaka berada di antara 0,5-2,0  $\mu\text{g/mL}$ . Rekapitulasi nilai KHM kolistin sulfat terhadap *E. coli* yang didapatkan dari sampel apus kloaka pada ayam pedaging kontrol terdapat sebagaimana dalam Tabel 1. Ayam pedaging kontrol ini dalam pemeliharaannya selama penelitian tidak terpapar dengan kolistin sulfat baik melalui pakan maupun air minum. Akan tetapi pada Tabel 1, disajikan bahwa terdapat satu isolat *E. coli* resistan kolistin dari sampel daging mentah pada kelompok kontrol, yaitu daging yang berasal dari ayam dengan kode III18.

Hasil rekapitulasi nilai KHM isolat-isolat *E. coli* yang didapatkan dari apus kloaka umur satu hari hingga 40 hari serta sampel daging dari kelompok ayam pedaging yang mendapat kolistin sulfat dengan dosis 5  $\mu\text{g/g}$  pakan terdapat dalam Tabel 2. Dosis 5  $\mu\text{g/g}$  pakan merupakan dosis pemacu pertumbuhan yang disarankan

sesuai dengan label dosis sediaan produk kolistin sulfat yang digunakan. Pada kelompok ini tidak ditemukan *E. coli* pada apus kloaka ayam berumur satu hari. Adapun pada umur 10 hari ditemukan adanya satu ekor ayam yang memiliki isolat *E. coli* resistan kolistin yaitu pada ayam kode I5. Saat pengambilan apus kloaka umur 20 hari didapatkan lagi dua ekor ayam yang memiliki *E. coli* resistan yaitu ayam dengan kode I2 dan I9. Adapun pada umur 30 hari dan 40 hari masing-masing didapatkan satu ayam ayam pedaging yang memiliki *E. coli* resistan kolistin (ayam kode I18 dan I4). Berdasarkan hasil sebagaimana tersaji dalam Tabel 2, hingga umur 40 hari dari kelompok ini dari 18 ekor ayam pedaging didapatkan lima ekor memiliki *E. coli* resistan kolistin dengan nilai KHM 4-8  $\mu\text{g/mL}$ . Sebagaimana kelompok ayam pedaging kontrol, dari sampel daging mentah didapatkan satu *E. coli* resistan yang berasal dari ayam I15. Selama pengambilan apus kloaka dari ayam tersebut tidak didapatkan *E. coli* resistan kolistin.

Bakteri *E. coli* resistan kolistin pada

kelompok ayam pedaging yang diberi kolistin sulfat dengan dosis 80.000 iu/kg BB selama tiga hari berturut-turut pada umur 1-3 hari, didapatkan dari sampel apus kloaka dua ekor ayam pada umur 10 hari. Adapun nilai KHM untuk kedua isolat tersebut adalah 4 µg/mL. Sebagaimana data nilai KHM yang tersaji dalam Tabel 3, dari kelompok ini tidak ditemukan lagi ayam yang memiliki *E. coli* resistan kolistin pada umur 20, 30, dan 40 hari. Pada Tabel 3 juga disajikan bahwa dari sampel daging mentah didapatkan satu sampel daging berasal dari ayam kode II10 memiliki *E. coli* resistan kolistin.

Berdasarkan nilai KHM *E. coli* yang didapatkan dari sampel apus kloaka pada Tabel 1-3, pada kelompok kontrol tidak didapatkan adanya *E. coli* yang resistan kolistin. Hasil uji resistensi pada kelompok perlakuan menunjukkan jumlah ayam yang memiliki *E. coli* resistan kolistin dari kelompok perlakuan dengan pemberian kolistin sulfat 5 µg/g pakan selama 40 hari adalah lebih tinggi dari kelompok perlakuan yang diberi kolistin sulfat 80.000 iu/kg BB selama tiga hari, yaitu 27,78% dan 11,11%. Rekapitulasi persentase *E. coli* resistan kolistin dari preparat apus kloaka dan daging mentah tiap kelompok disajikan pada dalam Tabel 4.

Dosis antibiotik untuk pemacu pertumbuhan yang digunakan merupakan dosis subterapi yang diharapkan dapat meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan (Dhama *et al.*, 2014). Akan tetapi, dosis subterapi yang diberikan dalam waktu yang lama memacu seleksi alami bakteri resistan terhadap antimikrob (Lessing, 2010). Oleh sebab itu, persentase ayam yang mendapatkan kolistin sulfat dengan dosis pemacu pertumbuhan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Uni Eropa telah melarang penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan sejak tahun 2006 (Marshall dan Levy, 2011). Grace

(2015) melaporkan bahwa sekitar 51% negara-negara di dunia telah melarang penggunaan antimikrob sebagai pemacu pertumbuhan, sedangkan 19% melarang secara parsial, dan 30% tidak melarang. Indonesia baru melarang penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan pada bulan Mei tahun 2017 melalui Peraturan Menteri Pertanian No. 14/Permentan/PK.350/5/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan. Berdasarkan Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi IX, terdapat delapan obat hewan yang mengandung kolistin sulfat yang terdaftar dengan indikasi sebagai pemacu pertumbuhan (DJPKH 2016).

Pemberian antibiotik pada ayam pedaging umur 1-3 hari atau pada saat umur-umur yang dianggap rentan merupakan praktek yang umum dilakukan oleh peternak. Tujuan pemberian dosis terapi pada ayam sehat pada umur-umur tertentu adalah untuk mencegah terjadinya infeksi bakteri patogen, atau dikenal dengan istilah *flushing*. Pemberian antibiotik dengan tujuan yang tidak tepat, berpotensi untuk membunuh mikroflora normal yang peka kolistin sulfat akan tetapi pada saat bersamaan bakteri resistan kolistin sulfat akan berkembang biak.

Pada penelitian ini didapatkan tiga isolat (5,56%) *E. coli* resistan kolistin dari sampel daging mentah yang semuanya berasal dari ayam yang pada saat pengujian apus kloaka tidak menunjukkan adanya *E. coli* resistan kolistin. Adanya *E. coli* resistan kolistin pada sampel daging mentah tersebut diduga akibat daging terpapar *E. coli* resistan kolistin pada saat proses pemotongan di RPUSK. Dugaan ini berdasarkan pemotongan dan pembersihan ayam pada alat pencabut bulu dari semua ayam percobaan dilakukan pada waktu dan lokasi RPUSK yang sama. Hal ini mengindikasikan adanya risiko penyebaran bakteri resistan kolistin sulfat di RPUSK. Penanganan ayam selama di RPUSK dari datang hingga dipotong

Tabel 4. Rekapitulasi persentase isolat *E. coli* resistan kolistin sulfat berdasarkan kelompok dan jenis sampel

Kelompok Ayam	Jenis Sampel		
	Swab Kloaka	Daging Mentah	Daging Matang
Kontrol	0%	5.56%	Tidak ada isolat <i>E. coli</i>
Diberi kolistin sulfat 5 µg/g pakan	27.78%	5.56%	Tidak ada isolat <i>E. coli</i>
Diberi kolistin sulfat 80.000 iu/kg BB selama 3 hari	11.11%	5.56%	Tidak ada isolat <i>E. coli</i>

sangat penting dalam risiko kontaminasi bakteri resistan ke daging. Penanganan daging mentah harus sangat diperhatikan, karena pada alur ini memiliki risiko penyebaran bakteri resistan yang berasal dari hewan ke manusia (Lekshmi *et al.*, 2017; Schrauwen *et al.*, 2017). Temuan *E. coli* resistan kolistin sulfat pada daging ayam juga dilaporkan oleh Monte *et al.* (2017) yang menemukan isolat *E. coli* resistan kolistin sebanyak 19,5% dari sampel yang diambil dari beberapa pasar di Sao Paolo, Brasil.

Semua sampel daging yang telah dimasak dalam penelitian ini tidak ada satupun ditemukan adanya *E. coli* sebab *E. coli* pada sampel mati akibat perebusan daging dalam air mendidih selama 30 menit. Hal ini sesuai dengan laporan penelitian Lee dan Kaletunç (2002) yaitu *E. coli* mati atau inaktif apabila terpapar suhu yang tinggi atau 100°C ke atas. Oleh sebab itu, untuk mengurangi risiko bakteri resistan pada makanan, maka harus dipastikan bahwa daging dimasak pada suhu yang dapat membunuh bakteri.

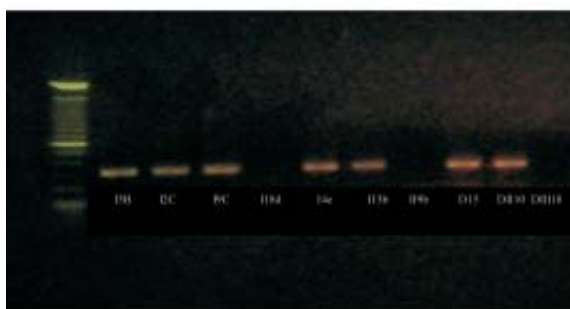
**Deteksi dan Transfer Gen *mcr-1***

Deteksi gen *mcr-1* dilakukan pada 13 isolat *E. coli* resistan kolistin dari ayam pedaging yang mendapat kolistin sulfat 5 µg/g pakan, sebanyak lima isolat dengan kode isolat: I5B, I2C, I9C, I18D, dan I4E, dua isolat dari ayam pedaging yang diberi kolistin sulfat 80.000 iu/kg BB dengan kode isolat II3B dan II9B, serta tiga isolat *E. coli* dari daging mentah dengan kode isolat DI15, DII10, dan DIII18. Deteksi dilakukan dengan PCR dengan primer CLR-F dan CLR-F (Liu *et al.*, 2015; Cavaco *et al.*, 2016). Sebagaimana dalam Gambar 1. didapatkan empat isolat isolat (22.22%) dari kelompok yang mendapat dosis 5 ug/g pakan terdeteksi membawa gen *mcr-1* yaitu isolat I5B, I2C, I9C, dan I4E. Gen *mcr-1* juga ditemukan pada satu (5,56%) isolat *E. coli* resistan kolistin dari kelompok yang mendapatkan kolistin sulfat 80.000 iu/kg BB (isolat II3B) dan dua isolat (3,70%) dari sampel daging mentah (isolat DI15 dan DII10).

Hasil pencampuran biakan isolat *E. coli* kolistin resistan kode DI15 dengan *S. enteritidis* ATCC 13076 yang peka terhadap kolistin sulfat menghasilkan koloni *S. enteritidis* ATCC 13076 yang bisa tumbuh pada media DHL dengan konsentrasi kolistin sulfat 2 µg/mL. Isolat *S. enteritidis* ATCC 13076 yang menjadi resistan kolistin tersebut dikonfirmasi dengan uji cepat menggunakan media RSA. Isolat yang tumbuh

pada media RSA menunjukkan kesesuaian dengan *Salmonella* yaitu koloni berbentuk bulat dan berwarna ungu. Dua koloni *S. enteritidis* yang tumbuh diberi kode isolat SE DI15-12 dan SE DI15-13. Kedua isolat tersebut diuji resistansinya terhadap kolistin sulfat dengan metode *agar dilution* dan didapatkan nilai KHM dari kedua isolat tersebut adalah 4 µg/mL.

Guna lebih memastikan bahwa kedua isolat tersebut adalah benar *S. Enteritidis* ATCC 13076 maka dikonfirmasi dengan menggunakan PCR. Sebagaimana dalam Gambar 2, isolat *S. enteritidis* kode SE DI15-12 dan SE DI15-13 menunjukkan pita amplikon yang sama yaitu 304 bp sebagaimana kontrol positif *S. enteritidis*



Gambar 1 Hasil PCR Gen *mcr-1* 13 Isolat *E. coli* Resistan Kolistin

Keterangan: Isolat *E. coli* kode I5B, I2C, I9C, I4E, II3B, DI15, dan DII10 positif memiliki gen *mcr-1* dengan adanya pita amplikon 309 bp. Isolat *E. coli* kode I18D, II9B, dan DIII18 tidak memiliki gen *mcr-1* karena tidak menunjukkan pita amplikon target di 309 bp (Liu *et al.*, 2015; Cavaco *et al.*, 2016)



Gambar 2 Hasil Uji PCR Identifikasi *Salmonella enteritidis* Kode SE DI15-12 dan SE DI15-13 menunjukkan panjang pita amplikon yang sama dengan dengan kontrol positif (C +) *S. enteritidis* ATCC 13076 (target pita amplikon 304 bp)



ATCC 13076 yang masih peka terhadap kolistin. Kedua isolat tersebut kemudian diuji deteksi *gen mcr-1* dan keduanya positif memiliki *gen mcr-1*. Keberhasilan bakteri resipien menjadi resistan menunjukkan adanya perpindahan *gen mcr-1* dari *E. coli* donor (DI15) melalui plasmid atau konjugasi.

Resistensi bakteri terhadap kolistin diketahui disebabkan oleh perubahan di membran atau mutasi dari bakteri dan secara teori tidak bisa melalui elemen genetik yang bergerak (Li *et al.*, 2006). Akan tetapi teori tersebut dipatahkan dengan ditemukannya *gen mcr-1* pada tahun 2015 oleh Liu *et al.* *Gen mcr-1* merupakan anggota enzim fosfatetanolamin transferase yang akan menyebabkan penambahan fosfatetanolamin pada *lipid A E. coli*. Adanya modifikasi pada *lipid A* akan menurunkan afinitas bakteri terhadap polimiksin sehingga bakteri menjadi tidak peka terhadap polimiksin (Liu *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016).

*Gen mcr-1* dalam plasmid memungkinkan adanya transfer sifat resistan terhadap kolistin dari *E. coli* resistan kolistin melalui konjugasi ke bakteri lain yang peka misalnya ke *E. coli J53*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Liu *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016). Penemuan *gen mcr-1* ini langsung direspons oleh berbagai negara dengan melakukan pemantauan dan surveilans *gen* tersebut pada hewan produksi maupun produknya (Cannatelli *et al.*, 2016; Malhotra-Kumar *et al.*, 2016; Irrgang *et al.*, 2016; Schrauwen *et al.*, 2017).

Hasil penelitian ini menunjukkan persentase *E. coli* resistan kolistin sulfat dari sampel apus kloaka lebih rendah apabila dibandingkan dengan resistansi *E. coli* terhadap antimikrob lainnya, misalnya oksitetrasiklin. Sumadi *et al.* (1999) melaporkan bahwa 74,9% isolat *E. coli* resistan oksitetrasiklin. Persentase *E. coli* resistan kolistin yang berasal dari daging juga di bawah resistansi *E. coli* terhadap antimikrob lainnya. Susanto (2014) melaporkan bahwa *E. coli* resistan terhadap: tetrasiklin (89,5%), ampicilin (89,5%), asam nalidiksik (94,7%), dan enrofloxasin (89,5%). Meskipun demikian, tujuh dari 10 (70%) isolat *E. coli* resistan kolistin sulfat pada penelitian ini memiliki *gen mcr-1*. Hal ini juga menunjukkan adanya keterkaitan yang cukup tinggi antara fenotip resistan kolistin dan keberadaan *gen mcr-1*.

Adanya *gen* resistan antimikrob yang dengan mudah menyebar ke bakteri lain mengancam kesehatan hewan dan manusia. Resistansi bakteri terhadap antimikrob dapat menyebabkan peningkatan kerugian materi akibat kegagalan pengobatan, penurunan kualitas hidup, kematian, meningkatnya biaya perawatan dan pengobatan, serta mengurangi keberhasilan program-program peningkatan kesehatan dan pengendalian penyakit menular (Lestari *et al.*, 2012). Peningkatan kasus pasien yang mengalami infeksi bakteri resistan kolistin yang disertai dengan mortalitas yang tinggi, menyebabkan ancaman yang sangat serius bagi penanganan penyakit akibat infeksi bakteri gram negatif multiresistan (Kontopoulou *et al.*, 2010; Mezzatesta *et al.*, 2011; Capone *et al.*, 2013). Oleh sebab itu, pemantauan dan surveilans resistensi terhadap kolistin di Indonesia seharusnya menjadi salah satu prioritas dalam dunia kesehatan hewan.

Penggunaan antimikrob secara tepat dan bertanggungjawab baik baik dalam bidang kesehatan hewan mau pun manusia sangat penting dalam penanganan ancaman resistansi. Selain itu, penanganan hewan dan produk asal hewan sebelum dimasak juga harus ditangani sebaik mungkin untuk mengurangi risiko penyebaran bakteri resistan.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini maka sebaiknya penggunaan kolistin sulfat pada hewan produk sebaiknya mulai dikurangi dan hanya digunakan sebagai terapi. Pemantauan dan surveilans resistansi kolistin beserta *gen mcr-1* secara rutin disemua sektor hewan produksi baik dari peternakan hingga ke produknya harus menjadi proritas dalam penanganan masalah resistansi antimikrob.

## SARAN

Penulis menyarankan agar dilakukan pemantauan dan surveilans resistansi kolistin terhadap bakteri zoonosis lainnya pada hewan produk selain ayam pedaging beserta produknya dan juga pada manusia yang berinteraksi langsung dengan hewan produksi

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kepala BBPMSOH, staf penguji di Unit Uji Farmasetik dan Premiks, Unit Uji Bakteriologi, Unit Hewan Percobaan, Unit Biotek, staf *Supply Center* BBPMSOH dan BPPSDM Pertanian-Kementerian Pertanian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. 2004. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 42(4): 1734-1738
- Bahera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, Farooque K, Sharma V, Misra MC. 2010. Evaluation of Susceptibility Testing Methods for Polymixin. *Int J Infect Dis* 14: 596-601.
- Barnes EM, Impey CS, Cooper DM. 1980. Manipulation of The Crop and Intestinal Flora of The Newly Hatched Chick. *ACJN* 33 (11 Supl): 2426-2433
- Bozorgmehri Fard, M.H. 2004. The Effect of Colistin Sulfate in Feed on the Controlling of *Salmonella enteritidis* Contamination in a Broiler Farm. *Archives of Razi Insitute* 58:105-110
- [BSAC] British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 2016. BSAC To Actively Support the EUCAST Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing in Preference to The Current BSAC Disc Diffusion Method. United Kingdom
- Cannatelli A, Giani T, Antonelli A, Principe L, Luzzaro F, Rossolini GM. 2016. First Detection of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene in *Escherichia coli* in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60: 3257-3258
- Capone A, Giannella M, Fortini D, Giardano A, Meledandri M, Ballardini M, Venditti M, Bordi E, Capozzi D, Balice MP, Tarasi A, Parisi G, Lappa A, Carattoli A, Petrosillo N, behalf of the SEERBIO-GraB network. 2013. High Rate of Colistin Resistance Among Patients with Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection Accounts for an Excess of Mortality. *Clin Microbiol Infect* 19: E23-30
- Cavaco L, Mordhorst H, Hendriksen R. 2016. Laboratory Control: PCR for Plasmid-mediated Colistin Resistance genes, *mcr-1* and *mcr-2* (multiplex) Version 2. European Union Reference Laboratory Antimicrobial Resistance. DTU Food – National Institute, Denmark. [Internet] [Diunduh tanggal 24 Juli 2017]. Terdapat dalam <http://www.eurl-ar.eu>
- Catry B, Cavaleri M, Babtiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Navas AL, MacKay D, Magiorakos AP, Romo MAM, Moilun G, Madero AM, Pomba MCMF, Powell, Pyorala S, Rantala M, Razauskas M, Sanders P, Teale C, Threfall, Tornele K, Van Duijkeren E, Edo JT. 2015. Use of Colistin-Containing Products Within European Union And European Economic Area (EU/EEA): Development of Resistance in Animals and Possible Impact On Human and Animal Health. *Int J Antimicrob Agents* 46(3): 297-306
- [CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute. 2016. M100S: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 26<sup>th</sup> Ed. CLSI. USA. pp: 52-54, 196
- Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. 2009. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. *Food Safety CID* 49: 132-141
- Coloe PJ, Bagust TJ, Ireland L. 1984. Development of The Normal Gastrointestinal Microflora of Specific Pathogen Free Chicken. *J Hyg (London)* 92(1): 79-87
- Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. 2015. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods Among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Actinobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 59(8): 4625-4630

- Dhama K, Tiwari R, Khan RU, Chakraborty S, Gopi M, Karthik K, Saminathan M, Desingu PA, Sunkara LT. 2014. Growth Promoters and Novel Feed Additives Improving Poultry Production and Health, Bioactive Principles and Beneficial Applications: The Trends and Advances-A Review. *Int J Pharm* 10(3): 129-159.
- [DJPKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2016. Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi IX. Jakarta. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- [EUCAST] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 7.1. [Internet] Diunduh pada 20 Maret 2017. Terdapat dalam [www.eucast.org](http://www.eucast.org)
- Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin the Revival of Polymixins for the Management of Multidrug-Resistant Gram Negative Bacterial Infection. *Clin Infect Dis* 40: 1333-1341.
- Filho KHC, Brito KCT, Cavalli LS, Brito BG. 2015. Avian Patogenic *Escherichia coli* (APEC) – an Update Control. The Battle Against Microbial Patogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs: 598-618
- Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Ye H, Liu F, Srinivas S, Li D, Zhu B, Lin J, Liu YH, Tian GB, Feng Y. 2016. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog* 12(11): e1005957. doi:10.1371/journal.ppat.1005957
- Grace D. 2015. Review of evidence on antimicrobial resistance and animal agriculture in developing countries. International Livestock Research Institute (ILRI). DOI: [http://dx.doi.org/10.12774/eod\\_crjune2015.graced](http://dx.doi.org/10.12774/eod_crjune2015.graced). pp: 8-18
- Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen BA, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, Roesler U, Käsbohrer A. 2016. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. *PLoS ONE* 11(7): e0159863
- Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, Kriti M, Koteli A, Antoniadou E, Sofianou D. 2010. Hospital Outbreak Caused by *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-2  $\beta$ -lactamase Resistant to Colistin. *J Hosp Infect* 76: 70-73
- Lan Y, Vertegen MWA, Tamminga S, Willi BA. 2005. The Role of The Commensal Gut Microbial Community in Broiler Chickens. *Worlds Poult Sci J* 61: 95-104
- Lee J, Kaletunç G. 2002. Evaluatin of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differentiation Scanning Calorimetry. *Appl Environmental Microbiol* 68(11): 5379-5386
- Lekshmi M, Ammini P, Kumar S, Varela MF. 2017. The Food Production Environment and The Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. *Microorganisms* 5: 17.
- Lessing A. 2010. Killing Us Softly: How Sub-Therapeutic Dosing of Livestock Causes Drug-Resistant Bacteria in Humans. *Boston Coll Environ Aff Law Rev* 37: 463-491
- Lestari ES, Severin JA, Verbrugh HA. 2012. Antimicrobial Resistance Among Pathogenic Bacteria in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 43(2): 422
- Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. 2006. Colistin: Tre Re-Emerging Antibiotic for Multidrug-Resistant Gram Negative Bacterial Infections. *Lancet Infect Dis* 6: 589-601
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R., Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lu L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2015. Emergence of Plasmid-mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 In Animals and Human Being In China: A Microbiological and Molecular Biology Study. *Lancet Infect Dis* 201; published online 18 November 2015. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Hoang HTT, Phan NT, H. 2016. Colistin resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. [Internet]. Diunduh pada 27 Mei 2016. Terdapat dalam [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00014-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00014-1)
- Marshall BM, Levy SB. 2011. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* 24(4): 718-735

- Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, Santagelo C, Stefani S. 2011. Outbreak of KPC-3-producing, and Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* Infection in Two Sicilian Hospital. *Clin Microbiol Infect* 17(9): 1444-1447
- Monte DF, Mem A, Fernandes MF, Cardeira L, Esposito F, Galvao JA, Franco BDGM, Lincopan N, Landgraf M. 2017. Chicken Meat as Reservoir of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 16 (Issue 5 e02718-16): 1-4
- Morales AS, Araujo JF, Moura Gomes VT, Costa ATR, Rodrigue DP, Ferreira TSP, Lima Filsner PHN, Felizardo MR, and Moreno AM. 2012. Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* Strains Isolated from Swine in Brazil. *The Sci World J* 1-4
- Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ, HO MH, Thwaites G, Ngo HT, Baker S, Carrique-Mas J. 2016. Use of Colistin and Other Critical Antimicrobials on Pig and Chicken Farms in Southern Vietnam and Its Association with Resistance in Commensal *Escherichia coli* Bacteria. *App Environ Microbiol* 82(13): 3727-3735
- Nordmann P, Jayol A, Poirel L. 2016. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 22(6): 1038-1043
- Schrauwen EJA, Huizinga P, Spreuwl Nv, Verhulst C, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Kluytmans AJW. 2017. High Prevalence of The *mcr-1* Gene in Retail Chicken Meat in the Netherlands in 2015. *Antimicrob Resist Infect Control* 6: 83
- Schwarz S dan Johnson AP. 2016. Transferable Resistance to Colistin a New But Old Threat. *J Antimicrob Chem* 71: 2066-2070
- Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. 2016. Early Emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals. [Internet] [Diunduh pada 27 Mei 2016] Terdapat dalam [www.thelancet.com/infection](http://www.thelancet.com/infection) Vol.16 March 2016
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2008. SNI 2897 tentang Metode Pengujian Cemarkan Mikroba dalam Daging, Telur, dan Susu, serta Hasil Olahannya. Jakarta. Badan Standardisasi Nasional.
- Sumadi, Mariana S, Istiyarningsih, Nakamura M. 1999. Drug Resistance and Conjugative R Plasmids in *Escherichia coli* Strains Isolated From Cattle, Pigs, and Chickens In Indonesia. *Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan* No. 6: 1-6.
- Susanto E. 2014. *Escherichia coli* yang Resistan Terhadap Antibiotik yang Diisolasi Dari Ayam Broiler dan Ayam Lokal di Kabupaten Bogor. *Tesis*. Bogor. Institut Pertanian Bogor
- Ventola CL. 2016. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *Pharm.Ther.* 40(4): 277-283
- [WHO] World Health Organization. 2011. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. [Internet] [Diunduh pada 20 Desember 2016]. Terdapat dalam [apps.who.int/iris/handle/10665/241504485](http://apps.who.int/iris/handle/10665/241504485)\_eng
- [WHO] World Health Organization. 2016. Antimicrobial Resistance. [Internet] [Diunduh pada 23 Oktober 2016]. Terdapat dalam <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- [OIE] World Organization for Animal Health. 2016. Terrestrial Animal Health Code Ed. 25<sup>th</sup>. OIE. Paris, France. Chapter 6.7-6.8
- Yi L, Wang J, Gao Y, Liu Y, Doi Y, Wu R, Zeng Z, Liang Z, Liu JH. 2017. *mcr-1*—Harboring *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Sequence Type 34 in Pigs, China. *Emerg Infect Dis* 23(2): 291-295