

Deteksi Gen Penyandi Resistensi *ampC* dan *mcr-1* pada *Escherichia coli* penyebab *Colibacillosis* Unggas di Sukabumi

(DETECTION OF GENE ENCODING RESISTANCE *AMPC* AND *MCR-1*
IN *ESCHERICHIA COLI* CAUSES AVIAN *COLIBACILLOSIS* IN SUKABUMI)

Agustin Indrawati¹, Ryan Septa Kurnia¹,
Ni Luh Putu Ika Mayasari¹

Program Studi Mikrobiologi Medik,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Raya Darmaga Kampus IPB Darmaga,
Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680
Tlp. (0251-8622642); Email: titin.seta@gmail.com

ABSTRAK

Resistensi antibiotik telah menjadi masalah global yang dapat mengancam kesehatan manusia maupun hewan. Penggunaan antibiotik pada ternak sebagai pengendalian dan terapi terhadap penyakit sering dikaitkan dengan penyebab terjadinya penyebaran bakteri resisten. Kejadian resistensi tak lepas dari keberadaan gen penyandi resistensi yang dapat berpindah antar bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen yang menyandi resistensi terhadap antibiotik ampisilin (*ampC*) dan kolistin (*mcr-1*) pada bakteri *Escherichia coli* yang berasal dari kasus colibacillosis di Sukabumi. Sebanyak 25 isolat arsip *E. coli* koleksi PT. Medika Satwa Lab digunakan pada penelitian ini. Keseluruhan isolat diidentifikasi menggunakan uji biokimia dan *polymerase chain reaction*/PCR kemudian dilakukan pengujian sensitifitas menggunakan metode difusi disk dan *minimum inhibitory concentrations* (MICs). Isolat yang resisten terhadap ampisilin dan kolistin selanjutnya dilakukan pengujian deteksi gen *ampC* dan *mcr-1* menggunakan PCR. Hasil penelitian menunjukkan seluruh isolat *E. coli* yang berasal dari kasus colibacillosis di daerah Sukabumi resisten terhadap ampisilin, dan dua di antaranya resisten terhadap fosfomisin (8%), namun tidak ditemukan satu pun isolat yang resisten terhadap colistin sulfat. Adapun keseluruhan isolat *E. coli* berhasil dideteksi gen penyandi resistensi *ampC* (100%). Hasil uji sensitivitas dan deteksi gen resistensi menunjukkan keseluruhan isolat resisten ampisilin dan memiliki gen penyandi resistensi *ampC*.

Kata-kata kunci: resistensi; antibiotik; gen; Sukabumi

ABSTRACT

Antibiotic resistance has become a global problem that can threaten human and animal health. The use of antibiotics in livestock as a treatment and control of disease is often associated with the cause of the spread of resistant bacteria. Resistance bacteria are caused by presence of resistant gene resistance that can move between bacteria. This study aims to detect the presence of genes that encode resistance to ampicillin (*ampC*) antibiotics and colistin (*mcr-1*) in *Escherichia coli* bacteria derived from cases of colibacillosis in Sukabumi. A total of 25 isolates of *E. coli* archive collection of PT. Medika Animal Lab is used in this research. All isolates identified using PCR were then tested for sensitivity using the disk diffusion method and minimum inhibitory concentrations (MICs). Isolates that are resistant to ampicillin and colistin were tested for detection of *ampC* and *mcr-1* genes using PCR. The results of the sensitivity test showed the whole isolates were resistant to ampicillin (100%) and phosphomycin (8%), but none were resistant to colistin sulphate. The total isolate *E. coli* successfully detected gene encoding resistance of *ampC* (100%). The results of sensitivity and resistance detection test showed that the whole isolates were ampicillin resistant and had the *ampC* resistance-encoding gene.

Keywords: resistance; antibiotics; gene; Sukabumi

PENDAHULUAN

Colibacillosis merupakan salah satu penyakit infeksi bakteri yang paling sering terjadi di peternakan unggas. Penyakit tersebut disebabkan oleh *Avian Pathogenic Escherichia coli*/APEC (Zhuang *et al.*, 2014). Bakteri *E. coli* patogen tersebut memiliki keberagaman serotipe yang tinggi, namun yang paling dominan sering menyerang unggas yakni serotipe O1, O2, dan O78. Adapun gejala klinis yang timbul akibat infeksi bakteri tersebut di antaranya gangguan pernafasan hingga gangguan sistemik yang dapat berakhir dengan kematian (Schouler *et al.*, 2012).

Penggunaan antibiotik sering dilakukan pada industri peternakan unggas sebagai tindakan pencegahan dalam menghadapi ancaman dari bakteri APEC. Secara umum pemberian antibiotik melalui pakan sering disebut dengan *growth promoter* (Subedi *et al.*, 2018). *World Health Organization* (WHO) mengelompokkan kejadian resistensi berdasarkan jenis antibiotik yang digunakan. *Critically important* yakni golongan antibiotik yang digunakan untuk terapi infeksi bakteri Gram negatif seperti derivat *phosphinic acid* (fosfomisin), polimiksin (colistin), dan *monobactam* (aztreonam). *Highly important* yakni golongan antibiotik yang digunakan untuk terapi bakteri Gram positif seperti golongan *streptogramins* (WHO 2011).

Gen *ampC* merupakan gen penyandi resistensi terhadap antibiotik golongan penisilin, *cephalothin*, *cefazolin*, *cefoxitin*, dan kombinasi *β-lactamase inhibitor-β-lactam* (Jacoby 2009). Menurut Gupta *et al.* (2014) gen *AmpC* dapat berpindah secara kromosomal maupun plasmid. Gen *mcr-1* merupakan gen penyandi resistensi terhadap antibiotik golongan polimiksin (kolistin). Gen tersebut diketahui mampu berpindah antar bakteri melalui plasmid sehingga memiliki potensi untuk menyebarkan sifat resistensinya pada bakteri lain (Liu *et al.*, 2016).

Menurut laporan dari Ditjennak (2015), Provinsi Jawa Barat memiliki populasi ayam pedaging yang tinggi yakni 45,3% dari populasi nasional. Jumlah tersebut berasal dari beberapa kabupaten di Jawa Barat di antaranya Sukabumi yang menduduki peringkat ketiga setelah Kabupaten Bogor dan Kabupaten Ciamis (BPS 2016). Informasi mengenai keberadaan gen resistensi pada bakteri patogen di daerah tersebut masih terbatas. Oleh karena itu

pemantauan/*monitoring* terkait kondisi kesehatan dan kejadian penyakit perlu dilakukan mengingat tingginya populasi unggas di daerah tersebut, khususnya kejadian infeksi yang disebabkan oleh bakteri resisten terhadap antibiotik.

METODE PENELITIAN

Sampel penelitian yang digunakan berupa 25 isolat *E. coli* penyebab *colibacillosis* yang diisolasi dari sampel ayam di peternakan asal Sukabumi, Jawa Barat pada tahun 2013 hingga 2017. Isolat ini merupakan koleksi dari PT. Medika Satwa Lab, selain itu juga digunakan isolat *E. coli* ATCC 25922 sebagai isolat referensi.

Kultur Isolat

Kultur dilakukan menggunakan agar *Mac Conkey* dari isolat arsip yang disimpan dalam *glycerol deep* pada suhu -20°C. Identifikasi ulang isolat arsip *E. coli* dilakukan secara makroskopis berdasarkan bentuk koloni pada agar *Mac Conkey* yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 18 jam. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram untuk melihat morfologi bakteri dengan bentuk batang Gram negatif. Koloni tunggal dari agar *Mac Conkey* yang telah diidentifikasi *E. coli* selanjutnya dikultur pada agar darah untuk konfirmasi dengan PCR dan pengujian sensitivitas antibiotik.

Identifikasi Isolat

Pengujian secara biokimia dilakukan pada koloni yang ditumbuhkan pada media agar *Mac Conkey* yang telah diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Uji biokimia yang dilakukan untuk mendeteksi *E. coli* antara lain menggunakan media kromogenik atau flourogenik mengandung *4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide* (MUG) yang digunakan untuk mendeteksi *E. coli* (Qabajah *et al.*, 2014). Selain itu juga dilakukan kultur pada media agar *Congo Red* kemudian diinkubasi pada suhu 35 selama 72 jam untuk melihat patogenitas dari *E. coli* (Sharma *et al.*, 2006).

Pengujian secara molekuler dilakukan dengan ekstraksi DNA bakteri *E. coli* dengan metode *boiling* pada suhu 95 selama 10 menit. Bagian supernatant diambil sebanyak 100 µL

merupakan DNA yang selanjutnya dapat digunakan pada deteksi gen target *E. coli*. Primer yang digunakan untuk deteksi *E. coli* pada gen target *uspA* (*uspAF*; 52 - CCGATACGCTGCCAATCAGT-32 dan *uspAR*; 52 - ACGCAGACCGTAGGCCAGAT-32) dengan ampikon 884 bp. Volume total reaksi PCR sebanyak 10 μ L, terdiri dari 1 μ L DNA *template*, 5 μ L *mastermix* (KAPA2G Fast Hotstart Readymix PCR Kit), 0,6 μ L primer *forward* 10 μ M, 0,6 primer *reverse* 10 μ M, dan 3,8 μ L H₂O. Proses amplifikasi diawali dengan pre denaturasi pada suhu 95 selama tiga menit, selanjutnya 35 siklus proses amplifikasi dengan suhu denaturasi 95 selama 30 detik, *annealing* pada suhu 58, ekstensi pada suhu 72 selama satu menit dan pada akhir amplifikasi dilanjutkan dengan final ekstensi pada suhu 72 selama lima menit (Osek, 2001; Rajput *et al.*, 2014). Sampel yang telah diamplifikasi selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan 1,5% agarose gel dan pewarnaan menggunakan *ethidium bromida* 0,5 μ g/ml. *Marker* yang digunakan 100 bp (VC 100 bp Plus DNA Ladder Vivantis) sebagai ukuran standar.

Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik Ampisilin dan Fosfomisin

Pengujian sensitifitas dilakukan dengan metode *disk diffusion Kirby-Bauer* menggunakan agar Mueller-Hinton berdasarkan *Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines*. Adapun antibiotik yang digunakan pada penelitian ini antara lain ampicilin (AMP) 10 μ g dan fosfomisin (FOS) 50 μ g. Suspensi bakteri didapat dari koloni bakteri yang diencerkan hingga mencapai standar McFarland 0,5 atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL, sebanyak 1 mL suspensi dituang kemudian diratakan pada agar Mueller-Hinton. *Disk diffusion* yang telah mengandung antibiotik diletakkan di atas agar Mueller-Hinton menggunakan pinset steril dengan jarak yang sama kemudian diinkubasi pada suhu 35 selama 16-18 jam dan diukur zona hambat antibiotik berdasarkan standar yang telah ditetapkan. Standar berupa kategori antara lain *susceptible* (S), *susceptible dose dependent* (SDD), *intermediate* (I), dan *resistant* (R). Kategori ditentukan dari rentangan diameter zona hambat antibiotik yang terbentuk pada agar Mueller-Hinton (CLSI 2016).

Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik Kolistin Sulfat

Pengujian sensitivitas dilakukan dengan

metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) berdasarkan *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* menggunakan *Mueller-Hinton Broth* (MHB) mikrodilusi khusus untuk colistin sulfat (EUCAST 2018). Sediaan colistin sulfat sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 mL H₂O sehingga diperoleh konsentrasi 1000 μ g/mL (ppm). Larutan tersebut sebanyak 80 μ L ditambahkan ke dalam 9920 μ L H₂O sehingga didapatkan 10 mL colistin sulfat dengan konsentrasi 8 μ g/mL (ppm). Colistin sulfat dengan konsentrasi 8 μ g/mL (ppm) tersebut kemudian dimasukkan ke dalam mikroplat sebanyak 100 μ L pada deret horizontal. Pengenceran dilakukan secara vertikal sebanyak 50 μ L pada sumuran yang telah berisi 50 μ L MHB. Inokulum merupakan suspensi bakteri dengan standar Mc Farland 0,5 atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL diencerkan dengan perbandingan 1/150 pada MHB sehingga didapatkan konsentrasi setara dengan 10^6 CFU/mL. Sebanyak 50 μ L inokulum tersebut kemudian ditambahkan pada tiap sumuran. Satu sumuran kontrol positif berisi media dan inokulum, satu sumuran lain berisi media saja tanpa inokulum untuk melihat ada tidaknya kontaminasi. Mikroplat yang berisi kontrol positif, kontrol negatif, dan sampel bakteri tersebut kemudian diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 35. Penentuan nilai MIC dilakukan berdasarkan hambatan pertumbuhan bakteri pada tiap sumuran (EUCAST 2018).

Deteksi Gen Penyandi Resistensi

Keberadaan gen penyandi resistensi antibiotik dideteksi dengan primer gen target *ampC* (ampisilin), *mcr-1* (kolistin) menggunakan PCR (Tabel 1). Volume total reaksi PCR sebanyak 10 μ L, terdiri dari 1 μ L DNA *template*, 5 μ L *mastermix* (KAPA2G Fast Hotstart Readymix PCR Kit), 0,5 μ L primer *forward* 10 μ M, 0,5 primer *reverse* 10 μ M, dan 4 μ L H₂O. Proses amplifikasi diawali dengan pre denaturasi pada suhu 95 selama tiga menit, selanjutnya 35 siklus proses amplifikasi dengan suhu denaturasi 95 selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50–60 sesuai dengan primer yang digunakan (Tabel 1), ekstensi pada suhu 72 selama satu menit dan pada akhir amplifikasi dilanjutkan dengan final ekstensi pada suhu 72 selama lima menit. Sampel yang telah diamplifikasi selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan 1,5% agarose gel

dan pewarnaan menggunakan *ethidium bromida* 0,5 µg/mL. *Marker* yang digunakan 100 bp (VC 100 bp Plus DNA Ladder Vivantis) sebagai ukuran standar.

Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dari hasil penelitian ini ditampilkan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur Isolat Penelitian

Hasil kultur menunjukkan 25 isolat arsip *E. coli* tumbuh dengan baik pada media agar *Mac Conkey*. Pengamatan secara makroskopis menunjukkan koloni berwarna merah muda dikelilingi zona keruh karena kemampuan *E. coli* dalam memfermentasi laktosa dan dikelilingi oleh endapan garam empedu. Endapan ini disebabkan oleh penguraian laktosa menjadi asam yang bereaksi dengan garam empedu (Markey *et al.*, 2013). Koloni tunggal *E. coli* yang tumbuh pada agar darah berbentuk sirkuler, permukaan kasar dengan elevasi *low convex*, dan berwarna keruh (*opaque*). Secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram, 25 isolat menunjukkan morfologi bakteri *E. coli* yaitu memiliki bentuk batang Gram negatif.

Identifikasi isolat *E. coli* dengan Uji Biokimia dan PCR

Uji biokimia menggunakan media kromogenik menunjukkan keseluruhan kultur isolat berubah warna menjadi biru dan berpendar pada sinar ultra ungu (UV). Kandungan substrat enzim kromogenik 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-GAL) pada media kromogenik digunakan untuk mendeteksi keberadaan enzim β-galaktosidase yang dimiliki bakteri golongan coliform (Gambar 1). Keberadaan enzim β-galaktosidase akan menghidrolisis X-GAL sehingga melepaskan komponen kromogenik yang berwarna biru, sedangkan untuk mendeteksi *E. coli* secara spesifik di dalamnya juga terdapat substrat 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG). Substrat tersebut terhidrolisis oleh enzim β-glucuronidase yang dimiliki oleh *E. coli* sehingga akan melepaskan 4-methylumbelliferone yang dapat berpendar dengan adanya paparan sinar ultra ungu/UV (Qabajah *et al.*, 2014).

Hasil kultur pada media agar *Congo Red* menunjukkan keseluruhan isolat *E. coli* secara makroskopis pada penelitian ini berwarna merah dan adanya ikatan warna pada inti koloni (Gambar 2). Ikatan pewarna *Congo Red* pada koloni bakteri berkaitan dengan keberadaan *galactosamine glycan* dan β-D-glucan. Polisakarida β-D-glucan pada membran sel bakteri diketahui berperan untuk melindungi diri dari respons imun inang. Sharma *et al.* (2006) menyatakan agar *Congo Red* dapat digunakan untuk membedakan secara umum

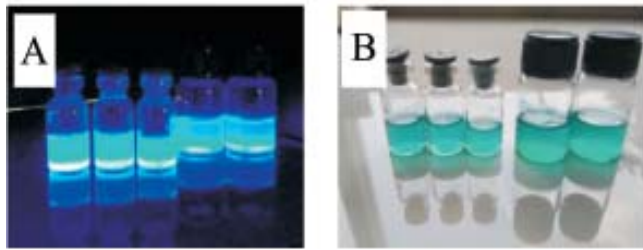
Tabel 1. Daftar primer gen penyandi resistensi

Antibiotik	Gen	Sekuen basa	Amplikon (bp)	Suhu annealing
Ampisilin	<i>ampC</i> ^a	(F) 52 -AATGGGTTTTCTACGGTCTG-32 (R) 52 -GGGCAGCAAATGTGGAGCAA-32	191	55
Kolistin	<i>mcr-1</i> ^b	(F) 52 -CGGTCAGTCCGTTTGTTC-32 (R) 52 -CTTGGTCGGTCTGTAGGG-32	309	58

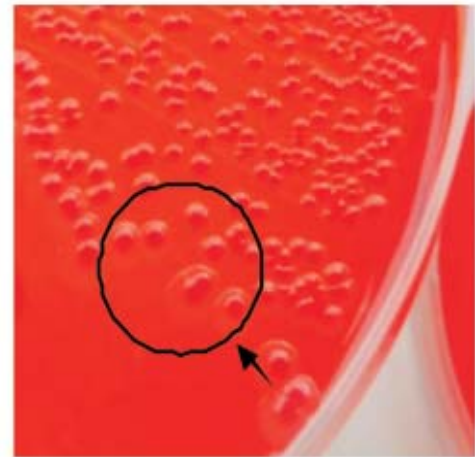
Keterangan: ^aampisilin (Brinas *et al.*, 2002), ^bcolistin (Liu *et al.*, 2016).

Tabel 2. Persentase resistensi antibiotik pada bakteri *E. coli* penyebab *colibacillosis* (n=25)

Antibiotik	Persentase berdasarkan kategori		
	Sensitif	Intermediate	Resisten
Ampisilin	0%	0%	100%
Fosfomisin	80%	12%	8%



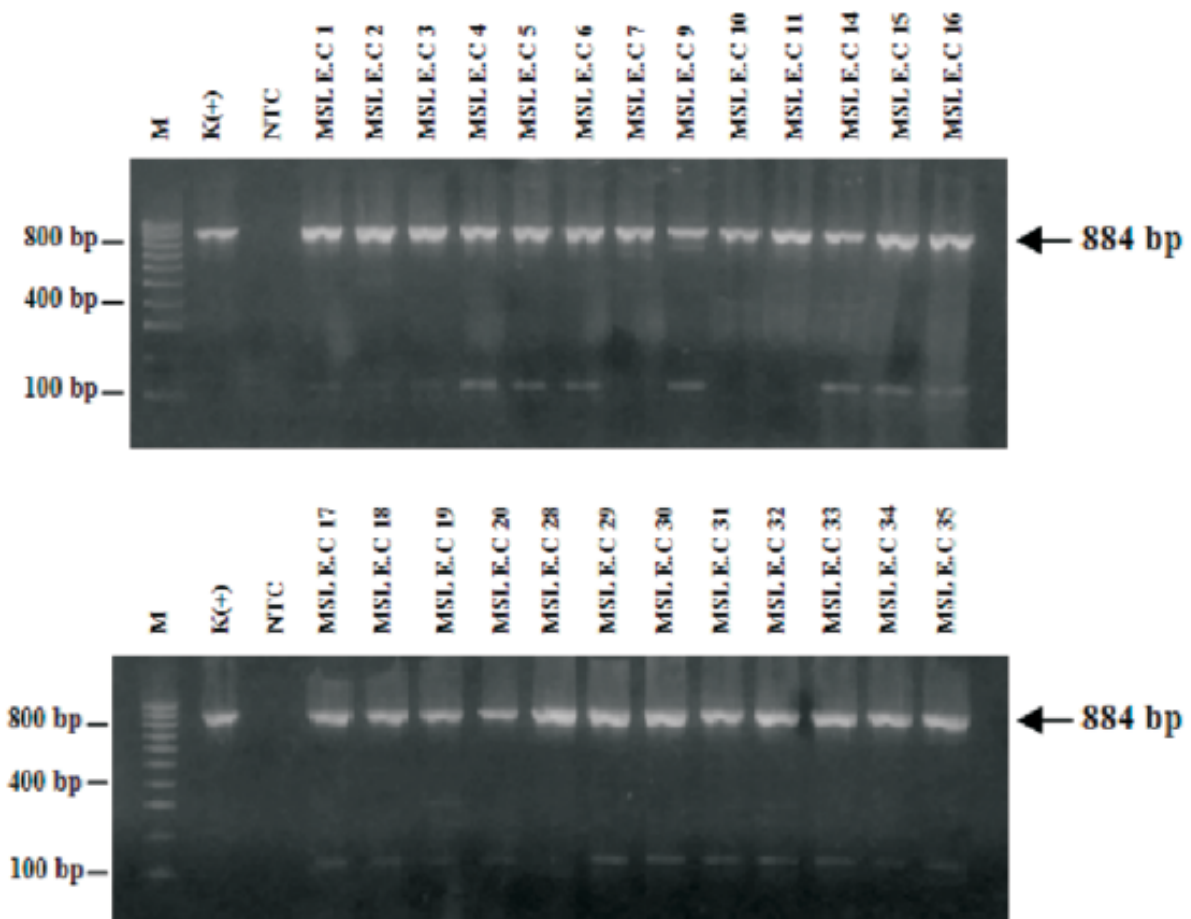
Gambar 1. Media kromogenik untuk identifikasi biokimia *Escherichia coli* di atas sinar Ultra ungu/UV transluminator (A) dan tanpa UV (B)



Gambar 2. Koloni *Escherichiamcoli* pada media agar Congo Red. Tanda panah menunjukkan koloni *E. coli* berwarna merah dengan warna lebih gelap pada bagian inti koloni.

jenis *E. coli* invasif dan non invasif. Berdasarkan hasil uji biokimia dapat disimpulkan bahwa semua isolat yang digunakan pada penelitian ini merupakan *E. coli* murni yang bersifat patogen.

Konfirmasi terhadap gen *uspA* yang spesifik terhadap *E. coli* juga dilakukan dengan metode PCR. Hasil PCR menunjukkan seluruh isolat



Gambar 3. Amplifikasi gen *uspA* (884 bp) yang spesifik terhadap *Escherichia coli*. Seluruh isolat menunjukkan hasil positif terhadap *uspA*. M: marker 100 bp; K(+): kontrol positif *E. coli* ATCC 25922. NTC: non template control.

positif dengan ampikon pada 884 bp sesuai dengan target menurut literatur yang diacu (Gambar 3). Gen *uspA* merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap munculnya ekspresi protein *sitoplasmic universal stress* spesifik pada *E. coli*. Protein tersebut akan terinduksi akibat kondisi stress seperti kadar nutrisi yang sangat rendah dan temperatur lingkungan yang tidak sesuai (Dawes *et al.*, 2010).

Sensitivitas Isolat terhadap Antibiotik

Hasil uji sensitivitas berdasarkan zona hambat yang terbentuk pada agar *Mueller-Hinton* pada 25 isolat yang diuji, menunjukkan hasil 100% resisten terhadap ampisilin dan 8% resisten terhadap fosfomisin (2 dari 25 isolat) (Tabel 2). Selain itu hasil uji sensitivitas juga menunjukkan adanya zona hambat dengan kategori *intermediate* terhadap fosfomisin sebesar 12%. Penggunaan *Antibiotic Growth Promoter* (AGP) menjadi salah satu penyebab tingginya kejadian resistensi terhadap ampisilin. Penambahan AGP pada pakan dilakukan untuk mengendalikan bakteri patogen penyebab penyakit. Penambahan tersebut menyebabkan bakteri patogen maupun bakteri flora normal tereliminasi, sehingga risiko kerugian akibat penyakit bakterial menurun dan produksi ternak meningkat. Kedua antibiotik tersebut telah digunakan sebagai campuran pakan ternak sejak 50 tahun lalu di Amerika Serikat dan beberapa negara lain. Penggunaan antibiotik tersebut sebagai AGP kini sangat terbatas dan dilarang oleh beberapa negara antara lain Belanda, Korea Selatan, dan negara-negara di Eropa (Dibner dan Richards, 2005). Indonesia telah melarang penggunaan AGP sejak tahun 2009, sesuai dengan UU Nomor 18 Tahun 2009 dan UU nomor 41 tahun 2014 pasal 22 ayat 4c tentang pelarangan penggunaan antibiotik pada pakan ternak, namun pelaksanaannya masih belum efektif. Penggunaan AGP di Indonesia tiap tahun sekitar 435 ton dengan konsentrasi berkisar antara 20–50 ppm (Puslitbangnak 2017).

Hasil uji resistensi terhadap colistin sulfat dengan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) mikrodilusi menunjukkan sebanyak 11 dari 25 isolat (44%) terhambat pertumbuhannya pada konsentrasi colistin sulfat 0,5 ppm, 12 dari 25 isolat (48%) terhambat pertumbuhannya pada konsentrasi 1 ppm, dan 2 dari 25 isolat (8%) terhambat pertumbuhannya pada konsentrasi 2 ppm (Tabel 3). Menurut

EUCAST (2018) bakteri golongan *Enterobacteriaceae* dikategorikan resisten dengan angka MIC > 2 ppm, sedangkan pada angka \leq 2 ppm dikategorikan sensitif. Berdasarkan angka MIC, hasil penelitian menunjukkan keseluruhan isolat yang digunakan masih sensitif terhadap colistin sulfat. Penelitian terkait penggunaan colistin dan sensitivitasnya pada peternakan unggas masih sangat sedikit. Adapun menurut Morales *et al.* (2012) penggunaan colistin sulfat memiliki efek terapeutik yang baik terhadap infeksi *E. coli* dan *Salmonella enterica* dengan kemungkinan resistensi yang rendah. Antibiotik tersebut diketahui lebih sedikit diabsorpsi oleh tubuh apabila digunakan secara per oral. Namun, beberapa tahun terakhir kejadian resistensi mulai banyak dilaporkan terutama pada bakteri komensal yang terdapat pada saluran pencernaan.

Pada penelitian ini seluruh isolat *E. coli* resisten terhadap ampisilin yang merupakan antibiotik paling umum digunakan sebagai terapi terhadap infeksi pada manusia dan hewan. Chotiah dan Damayanti (2016) dalam penelitiannya menyatakan sebanyak 98,7% *E. coli* penyebab colibacillosis di beberapa daerah di Jawa Barat resisten terhadap ampisilin. Resistensi terhadap antibiotik golongan beta-laktam pada *E. coli* disebabkan oleh adanya enzim beta-laktamase yang dapat menghidrolisis struktur cincin beta-laktam dan menginaktivasi kerja antibiotik tersebut (Brinas 2000).

Persentase resistensi paling rendah (8%) ditunjukkan terhadap antibiotik fosfomisin. Hal tersebut disebabkan oleh penggunaan antibiotik tersebut relatif jarang digunakan pada peternakan unggas. Mekanisme kejadian resistensi fosfomisin terutama pada *E. coli* berkaitan dengan perubahan permiabilitas sel bakteri dan modifikasi gen target *murA*. Plasmid yang membawa sifat resistensi terhadap fosfomisin antara lain gen *fosA3*, yang menyandi *glutathione S-transferase*. Enzim tersebut mengubah struktur, kemudian menginaktivasi fosfomisin (Alrowais *et al.*, 2015).

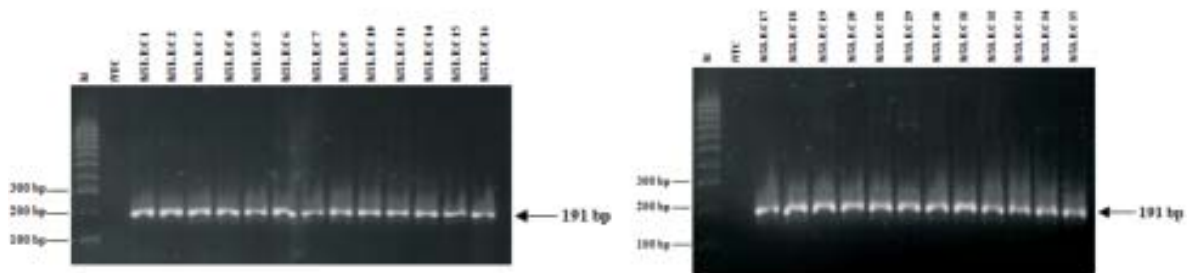
Deteksi Gen Resistensi

Deteksi molekuler gen *ampC* yang berkaitan dengan resistensi ampisilin menunjukkan hasil positif terhadap semua isolat *E. coli* dengan ampikon gen target 191 bp (Gambar 4). Gen *ampC* merupakan salah satu gen struktural yang berperan terhadap keberadaan enzim beta-laktamase. Enzim β -

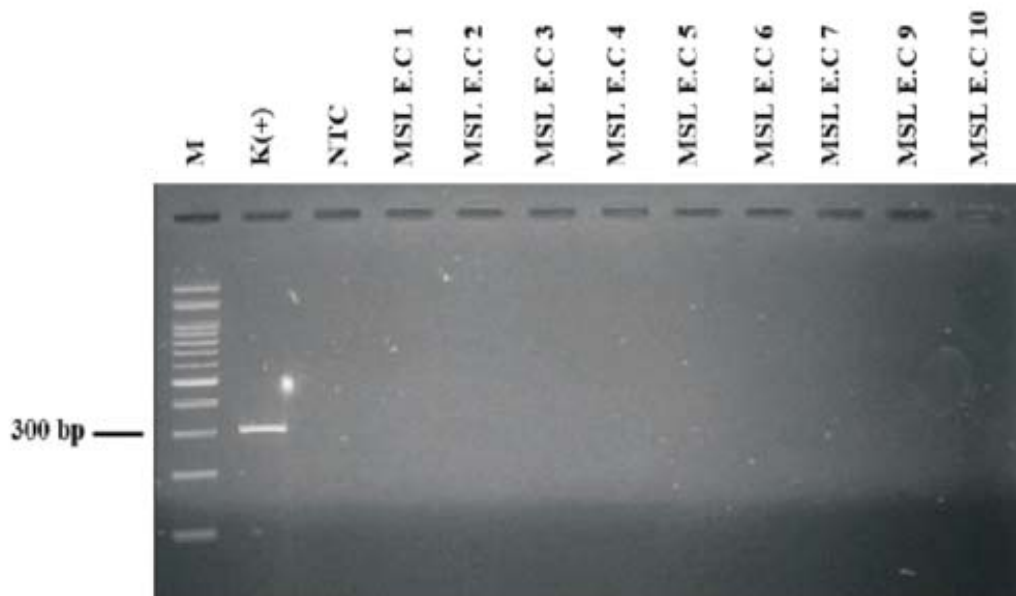
Tabel 3. Angka *minimum inhibitory concentration* isolat *E. coli* penyebab *colibacillosis* (n=25)

Konsentrasi colistin sulfat (ppm atau µg/mL)	Jumlah isolat ^a	Persentase (%)
0.25	0	0%
0,5	11	44%
1	12	48%
24	20	80%

Keterangan: ^aJumlah isolat yang terhambat pertumbuhannya



Gambar 4. Amplifikasi gen *ampC* (191 bp) penyandi resistensi ampisilin pada *Escherichia coli* penyebab *colibacillosis*. Seluruh isolat menunjukkan hasil positif terhadap *ampC*. M: *marker* 100 bp; NTC: *non template control*.



Gambar 5. Amplifikasi gen *mcr-1* (309 bp) penyandi resistensi kolistin pada *Escherichia coli* penyebab *colibacillosis*. Seluruh isolat menunjukkan hasil negatif terhadap *mcr-1*. M: *marker* 100 bp; K(+): kontrol positif *mcr-1* (*E. coli* DI15); NTC: *non template control*.

lactamase yang disandikan oleh gen *ampC* tersebut dapat menghidrolisis semua antibiotik golongan β -lactam kecuali cefepime dan carbapenems (Gupta *et al.*, 2014). Pada bakteri golongan *Enterobacteriaceae* ekspresi *ampC*

rendah, namun akan dapat terinduksi akibat adanya paparan antibiotik golongan beta-lactam. Mekanisme induksi tersebut kompleks dimulai dari terganggunya biosintesis *murein* akibat antibiotik golongan beta-lactam kemudian

berujung pada akumulasi dari *N-acetylglucosamine-1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid oligopeptides*. Bagian dari *N-acetylglucosamine* tersebut akan terlepas sehingga terbentuk bagian lain di antaranya *1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid tri-, tetra-, dan pentapeptida*. Oligopeptida tersebut berkompetisi dengan *oligopeptides UDP-N-acetylmuramic acid* untuk dapat menempel pada *AmpR*, yang merupakan bagian dari regulator transkripsional *LysR*. Gangguan pada sinyal *UDP-N-acetylmuramic acid peptides* menyebabkan perubahan pada *ampR*, sehingga *ampC* akan terekspresikan (Jacoby 2009).

Deteksi molekuler gen *mcr-1* menunjukkan negatif terhadap keseluruhan isolat. Hal tersebut membuktikan bahwa isolat yang masih sensitif terhadap colistin sulfat tidak memiliki gen penyandi resistensi *mcr-1*. Adapun pada penelitian ini digunakan kontrol positif *mcr-1 E. coli* DI15 yang berasal dari penelitian sebelumnya mengenai keberadaan gen *mcr-1* pada ayam *broiler* (Gambar 5). Gen *mcr-1* termasuk enzim golongan *phosphoethanolamine transferase* yang kemudian dapat menyebabkan perubahan pada struktur *lipid A* pada membran sel bakteri *E. coli* (Liu *et al.*, 2016). Perubahan tersebut yang menyebabkan terjadinya gangguan terhadap kerja antibiotik golongan polimixin (colistin). Gen *mcr-1* juga diketahui dapat berpindah melalui plasmid *IncI2* dengan kemampuan efisiensi konjugasi yang tinggi (Meinersmann, 2016).

SIMPULAN

Penggunaan antibiotik pada pakan ternak menyebabkan terjadinya resistensi pada bakteri patogen maupun non patogen. Kemampuan bakteri tersebut dipengaruhi oleh keberadaan gen resistensi yang terekspresi dan menimbulkan berbagai mekanisme pertahanan diri terhadap antibiotik. Berdasarkan hasil uji sensitivitas menunjukkan seluruh isolat *E. coli* yang diperoleh pada penelitian ini resisten terhadap ampicilin (100%), dan 8% isolat resisten terhadap fosfomisin. Tidak ditemukan isolat *E. coli* yang resisten terhadap colistin sulfat pada penelitian ini. Gen penyandi resistensi yang dapat dideteksi antara lain *ampC* sebesar 100%, sedangkan *mcr-1* tidak dapat dideteksi pada isolat *E. coli* yang sensitif terhadap kolistin sulfat.

SARAN

Penelitian lebih lanjut terkait resistensi *E. coli* non patogen terhadap antibiotika grup polymyxin B (Colistin) perlu dilakukan. Gen *mcr-1* yang merupakan penyandi terhadap colistin menjadi salah satu hal yang paling dikhawatirkan. Keberadaan bakteri komensal yang resisten di lingkungan dapat menjadi reservoir resistensi kemudian dapat memindahkan sifat resistensinya pada bakteri lain di lingkungan. Kemungkinan terjadinya perpindahan gen dapat diperantarai *mobile genetic element* berupa plasmid, transposon, ataupun dengan bantuan bakteriofag.

Penggunaan antibiotika baik sebagai AGP maupun terapi selayaknya diawasi secara ketat melalui monitoring. Uji sensitivitas dan deteksi gen resistensi secara berkala perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi yang ada di lapangan. Hal tersebut perlu dilakukan untuk mencegah terjadinya multiresistensi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan dengan bantuan dana dan fasilitas laboratorium mikrobiologi dari PT. Medika Satwa Laboratoris. Penulis mengucapkan terimakasih kepada PT. Medika Satwa Laboratoris atas kelangsungan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alrowais H, McElheny CL, Spychala CN, Sastry S, Guo Q, Butt AA, Doi Y. 2015. Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli*, Pennsylvania, USA. *Emerg Infect Dis* 21(11): 2045-2047.
- BPS (Badan Pusat Statistik). 2016. *Provinsi Jawa Barat dalam Angka*. Bandung (ID): BPS Provinsi Jawa Barat.
- Brinas L, Zarazaga M, Sa'enz Y, Larrea FR, Torres C. 2002. β -Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. *Antimicrob Agents Chemother* 46(10): 3156-3163.
- Chotiah S, Damayanti R. 2016. Colibacillosis and Antibiotics Resistance Patterns in Broiler. *Proc.Intsem Livestock Production and Veterinary Technology*. Hlm. 434-440

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2016. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. Wayne (US). CLSI. Hlm. 52–59.
- Dawes F, Kuzevski A, Bettelheim K, Hornitzky M, Djordjevic S, Walker M. 2010. Distribution of Class 1 Integrons with IS26-Mediated Deletions in Their 39-Conserved Segments in *Escherichia coli* of Human and Animal Origin. *J Pone* 5(9): e12754. doi:10.1371/journal.pone.0012754
- Dibner JJ, Richards JD. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science* 84: 634–643.
- Ditjennak (Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan). 2015. *Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan*. Jakarta (ID): Ditjennak Kementerian Pertanian RI.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). 2018. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Versi 8.0 [Internet]. [diunduh 2018 Januari 3]. Tersedia pada: <http://www.eucast.org>.
- WHO (World Health Organization). 2011. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 3rd rev. Geneva (CH). p 7.
- Gupta G, Tak V, Mathur P. 2014. Detection of *AmpC* β-Lactamases in Gram-negative Bacteria. *J Lab Physicians* 6(1): 1-6.
- Jacoby GA. 2009. *AmpC* beta-Lactamases. *American Society for* 22(1): 161-182.
- 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, Ly L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China. *Lancet Infect Dis* 16: 161-168.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2nd edition. Elsevier Science (London). p18-29.
- Meinersmann RJ, Ladely SR, Plumlee JR, Hall MC, Simpson SA, Ballard LL, Scheffler BE, Genzlinger LL, Cook KL. 2016. Colistin Resistance *mcr-1*-Gene Bearing *Escherichia coli* Strain from the United States. *Genome Announc* 4(5): e00898-16.
- Morales AS, Ara'ujo JF, Gomes VT, Costa AT, Rodrigues DP, Ferreira TS, Filsner PH, Felizardo MR, Moreno AM. 2012. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* strains isolated from swine in Brazil. *Sci World J* 4 hlm. Artikel ID 109795. doi:10.1100/2012/109795.
- Osek J. 2001. Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *J Vet Diagn Invest* 13(4): 308-311.
- Puslitbangnak (Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan). 2017. Kebijakan Pengendalian Penggunaan AGP dan Ractopamine dalam Mendukung Keamanan Pangan. Bogor (ID): Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Qabajah M, Awwad E, Ashhab Y. 2014. Molecular characterisation of *Escherichia coli* from dead broiler chickens with signs of colibacillosis and ready-to-market chicken meat in the West-Bank. *J British Poultry Sci* 55(4): 442-451. doi: 10.1080/00071668.2014.935998.
- Rajput SK, Gururaj K, Tiwari U, Singh G. 2014. Study of the characterization of *E. coli* isolates in goat kids. *Indian Res J Genet Biotech* 6(1): 324-329.
- Sharma KK, Soni SS, Meharchandani S. 2006. Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Vet Arhiv* 76: 363–366.
- Schouler C, Schaeffer B, Brée A, Mora A, Dahbi G, Biet F, Oswald E, Mainil J, Blanco J, Moulin-Schouleur M. 2012. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J Clin Microbiol* 50(5): 1673-1678.
- Subedi M, Luitel H, Devkota B, Bhattarai RK, Phuyal S, Panthi P, Shrestha A, Chaudhary DK. 2018. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Vet Res* 14(1): 113.
- Zhuang QY, Wang SC, Li JP, Liu D, Liu S, Jiang WM, Chen JM. 2014. A clinical survey of common avian infectious diseases in China. *Avian Dis* 58(2): 297-302.