

Sekuensing Gen *mcr-1* dari *Escherichia coli* dan *Salmonella* Enteritidis Resistan Kolistin

(SEQUENCING MCR-1 GENE FROM RESISTANT COLISTIN
ESCHERICHIA COLI AND SALMONELLA ENTERITIDIS)

Maria Fatima Palupi¹, Ernes Andesfha¹,
I Wayan Teguh Wibawan³, Hera Maheshwari²,
Huda Salahuddin Darusman^{2,4}, Etih Sudarnika³

¹Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan,
Kementerian Pertanian Republik Indonesia,

Jl. Raya Pembangunan Gunungsindur, Bogor, Jawa Barat 16340

²Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi

³Departemen Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan IPB University,

Jalan Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

⁴Pusat Studi Satwa Primata, IPB University,

Jalan Lodaya II, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

Email: lupi_ima@yahoo.co.id

ABSTRAK

Gen mobilized colistin resistance (mcr) merupakan gen resistan kolistin sulfat yang dapat dipindahkan melalui materi genetik bergerak semacam plasmid. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui jenis plasmid gen *mcr-1* dari dua isolat *Escherichia coli* resistan positif gen *mcr-1* dan dua isolat *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 yang menjadi resistan kolistin serta memiliki gen *mcr-1* setelah dikonjugasi dengan *E. coli* resistan kolistin positif gen *mcr-1*. Dua isolat *E. coli* diuji yaitu satu isolat *E. coli* yang berhasil mentransfer gen *mcr-1* ke isolat resipien *S. Enteritidis* ATCC 13076 dan satu isolat *E. coli* O157:H7 resistan kolistin positif *mcr-1*. Sekuensing gen *mcr-1* dengan panjang nukleotida 309 bp keempat isolat tersebut dianalisis di unit Biotek Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan dengan menggunakan *basic local alignment search tools* (BLAST) dan *software* MEGA7. Hasil analisis sekuensing menunjukkan gen *mcr-1* dengan panjang nukleotida 309 bp dari keempat isolat yang diuji memiliki homologi tinggi dengan data referen dari GenBank. Hasil penelitian ini menunjukkan sekuensing DNA gen *mcr-1* sampel lebih cenderung termasuk pada tipe plasmid IncI2 atau IncHI2. Dapat disimpulkan bahwa resistansi kolistin merupakan ancaman yang nyata karena gen resistan *mcr-1* yang ada di Indonesia berada di plasmid sehingga dapat disebarkan ke bakteri lain.

Kata kunci: gen *mcr-1*, plasmid, resistansi

ABSTRACT

The mobilized colistin resistance (*mcr*) gene is a colistin sulfate resistance gene that can be transferred through mobile genetic material such as plasmids. The purpose of this study was to determine the type of plasmid *mcr-1* gene from two isolates of colistin-resistant *Escherichia coli* positive *mcr-1* gene and two isolates of *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 which became colistin-resistant and had *mcr-1* gene after being conjugated with colistin-resistant *E. coli* positive *mcr-1* gene. Two *E. coli* isolates were tested as follow one *E. coli* isolate that successfully transferred the *mcr-1* gene to the *S. Enteritidis* ATCC 13076 as recipient isolate and one isolate resistant-colistin *E. coli* O157: H7 positive *mcr-1* gene. The sequencing of the *mcr-1* gene with nucleotide length of 309 bp of those four isolates was analyzed in the Biotek Center of National Veterinary Drug Assay Laboratory by using basic local alignment search tools (BLAST) and MEGA7 software. The results of sequencing analysis showed that the *mcr-1* gene with a nucleotide length of 309 bp from those four isolates tested had high homology with *gene* reference data from GenBank. The result of this study shows that DNA sequencing of the *mcr-1* gene of samples is more likely to belong to the IncI2 or IncHI2 plasmid types. It can be concluded that colistin resistance is a real threat because the *mcr-1* resistance gene in Indonesia is actually in the plasmid so that it can be transferred to other bacteria.

Keywords: *mcr-1* gene, plasmid, resistance

PENDAHULUAN

Sejak ditemukannya gen *mobilized colistin resistance-1 (mcr-1)* pada tahun 2015 oleh Liu *et al.* (2015) telah meningkatkan kesadaran dan perhatian dunia internasional tentang penggunaan kolistin sulfat di hewan produksi. Kolistin sulfat merupakan *last drug of choice* untuk menangani infeksi bakteri Gram negatif multiresistan bagi manusia. Pentingnya kolistin sulfat di manusia dilihat dengan dimasukkannya kolistin ke dalam *Highest Priority Critically Important Antimicrobials for Human* oleh Badan Kesehatan Dunia pada tahun 2017 (WHO 2017). Perkembangan dari temuan gen *mcr* sangat pesat, hingga Pebruari 2020 telah ditemukan 10 jenis gen *mcr* (Wanb *et al.* 2020). Gen *mcr-1* merupakan gen *mcr* yang paling sering ditemukan pada bakteri *E. coli* (Poirel *et al.* 2016).

Perpindahan gen *mcr-1* bisa melalui konjugasi plasmid, komposit transposon, transformasi, dan kromosom. Gen *mcr-1* terdapat dalam berbagai tipe plasmid dan sebagian besar terdapat dalam plasmid IncI2, IncHI2, serta IncX4 (Sun *et al.* 2018). Tipe plasmid tersebut dikenal memiliki korelasi yang kuat dengan berbagai gen resistan terhadap antimikrob. Misalnya penyebaran gen *bla*_{CTX-M-9} pada *E. coli* dan *S. enterica* serovar Virchow sebagian besar berkaitan dengan penyebaran plasmid-plasmid tipe IncHI2 (Carratolli 2009). Penelitian transformasi gen *mcr-1* yang dilakukan oleh Yi *et al.* (2017) juga ditemukan bahwa gen resistan *floR* (resistan *florfenicol*) dan gen *oqxb* (resistan olakuindok dan siprofloksasin) juga ikut berpindah bersama gen *mcr-1* ke bakteri resipien.

Beberapa penelitian menunjukkan gen *mcr-1* dikelilingi oleh dua *copy* IS*Apl*. IS*Apl* merupakan *insertion sequences* (IS) yang termasuk dalam transposon IS30. IS*Apl* memacu terbentuknya komposit transposon *Tn6330* (IS*Apl* -*mcr-1* ORF- IS*Apl*) yang mampu memindahkan gen *mcr-1* (Li *et al.* 2016; Poirel *et al.* 2016; Hadjadj *et al.* 2017). Sekuens IS*Apl* kadang tidak selalu ditemukan mengelilingi gen *mcr-1*. Pada beberapa kasus IS*Apl* ditemukan pada gen *TraE* yang akan menyebabkan inaktivasi gen IS*Apl* dan mempengaruhi kemampuan bakteri untuk mentransfer plasmid melalui konjugasi. IS*Apl* merupakan IS yang sangat aktif dan mampu untuk *transpose* dengan frekuensi yang sangat tinggi diberbagai *site insertion* yang nonspesifik. IS*Apl* telah

ditemukan *E. coli mcr-1* positif dalam beberapa tipe plasmid IncI2, IncFII, IncY, dan IncFIB (Hadjadj *et al.* 2017). Veldman *et al.* (2016) melaporkan IS*Apl* juga ditemukan pada gen *mcr-1* dengan tipe plasmid IncHI2 dan kromosom pada *E. coli* resistan kolistin.

Penelitian mengenai jenis plasmid gen *mcr-1* di Indonesia masih belum banyak dilakukan. Penelitian sebelumnya berhasil melakukan konjugasi gen *mcr-1* dari *E. coli* resistan kolistin yang memiliki gen *mcr-1* ke *S. Enteritidis* ATCC 13076 (Palupi *et al.* 2019^b). Transfer gen *mcr-1* dari *E. coli* donor ke resipien *S. Enteritidis* ATCC 13076 diduga disebabkan oleh perpindahan plasmid yang membawa gen *mcr-1* dari donor. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi plasmid gen *mcr-1* yang ditemukan dari isolat *E. coli* positif *mcr-1* dan memastikan bahwa plasmid yang ditransferkan ke *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 adalah sama. Kajian ini sangat penting untuk mengetahui tingkat risiko dari penyebaran gen *mcr-1* di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Sekuensing gen *mcr-1* dilakukan pada bakteri yang terdiri dari isolat *E. coli* DI15, *S. Enteritidis* DI15-12 (SE DI15-12), *S. Enteritidis* DI15-13 (SE DI15-13), dan *E. coli* K35d. Isolat *E. coli* DI15, *S. Enteritidis* DI15-12 (SE DI15-12), dan *S. Enteritidis* DI15-13 (SE DI15-13) merupakan hasil penelitian sebelumnya mengenai transfer gen *mcr-1* dari *E. coli* resistan kolistin ke *S. Enteritidis* ATCC 13076 yang peka kolistin sulfat (Palupi *et al.* 2018; Palupi *et al.* 2019^b). *Escherichia coli* DI15 merupakan *E. coli* donor yang mampu mentransfer gen *mcr-1* ke *S. Enteritidis* ATCC 13076 sehingga menjadi resistan terhadap kolistin dan memiliki gen *mcr-1*. Dua isolat *S. Enteritidis* ATCC 13076 yang menjadi resistan kolistin dan memiliki gen *mcr-1* diberi kode *S. Enteritidis* DI15-12 (SE DI15-12) dan *S. Enteritidis* DI15-13 (SE DI15-13). Adapun *E. coli* K35d merupakan *E. coli* patogen serotipe O157:H7 yang resistan kolistin dan memiliki gen *mcr-1* yang didapatkan dari penelitian sebelumnya yang dilakukan Palupi *et al.* (2019^a). Produk *polymerase chain reaction* (PCR) didapatkan dengan melakukan uji PCR deteksi gen *mcr-1* berdasarkan metode Liu *et al.* (2015) dan Cavaco *et al.* (2016) dengan beberapa modifikasi. Ekstraksi DNA dilakukan dengan memasukkan 1 *loop* ose isolat *E. coli*

atau *S. Enteritidis* ke dalam 100 µL reagen persiapan sampel PrepMan™ Ultra (Life-USA) kemudian direbus dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit. Komposisi *master mix* untuk 25 µL reaksi terdiri dari 12,5 µL Hotstart *master mix* (Qiagen-DEU), 1 µL (5 µM) primer *mcr-1* CLR-F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3') (Sigma-Aldrich-SGP), 1 µL (5 µM) primer *mcr-1* CLR-R (5'-CTTGGTTCGGTCTGTAGGG-3') (Sigma-Aldrich-SGP), DNA *template* 5 µL (*E. coli* konsentrasi 10x sedangkan *S. Enteritidis* 100x), dan H₂O (Qiagen-DEU) sampai dengan 25 µL. 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.

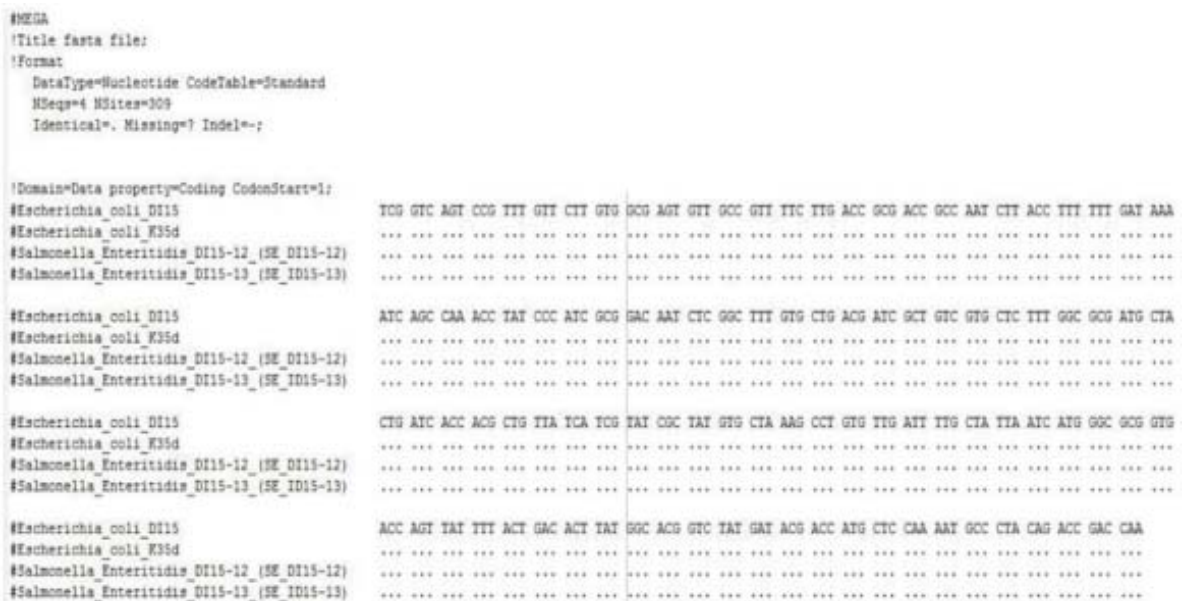
Produk PCR dari keempat isolat tersebut dikirimkan ke PT Genetika Science Indonesia untuk disekuensing dengan target gen *mcr-1* menggunakan primer *forward* 52 - CGGTCAGTCCGTTTGTTC-32 dan primer *reverse* 52 -CTTGGTTCGGTCTGTAGGG-32 .. Hasil sekuensing dari PT Genetika Science Indonesia dianalisis dengan menggunakan *basic local alignment search tools* (BLAST) dan *software* MEGA7. BLAST digunakan untuk menganalisis homologi asam nukleat dari gen *mcr-1* yang berasal dari sampel bakteri *E. coli* dan *S. Enteritidis* terhadap gen *mcr-1* yang terdapat di GenBank atau *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). *Software* MEGA7 digunakan untuk menganalisis estimasi perbedaan evolusi sekuen dengan menghitung

jumlah perbedaan basa nukleotida per *site* dari total sekuen yang diperoleh dengan membandingkan antara sampel yang diuji terhadap referensi sekuen yang terdapat di GenBank atau NCBI (Tamura *et al.* 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis identikal nukleotida sebagaimana yang ditampilkan pada Gambar 1 menunjukkan *E. coli* DI15 sebagai donor gen *mcr-1* memiliki nukleotida yang 100% identik dengan dua bakteri resipien, yaitu *S. Enteritidis* DI15-12 dan *S. Enteritidis* DI15-13. Hasil identik 100% tersebut menunjukkan adanya dugaan bahwa proses perpindahan gen *mcr-1* dari donor *E. coli* DI15 berhasil dipindahkan ke bakteri resipien melalui mekanisme *mobile genetic element*.

Gen *mcr-1* *E. coli* DI15 juga memiliki nukleotida identik 100% dengan gen *mcr-1* *E. coli* K35d. Kedua bakteri tersebut berasal dari sumber jenis sampel yang berbeda. *E. coli* DI15 berasal dari sampel daging broiler segar yang diambil rumah potong unggas skala kecil di Kecamatan Gunungsindur, Kabupaten Bogor. *E. coli* K35d berasal dari apus kloaka ayam broiler dari peternakan di Kecamatan Cigudeg, Kabupaten Bogor. Meskipun sumber jenis sampel berbeda, kedua sampel tersebut didapatkan dari area kabupaten yang sama, yaitu Kabupaten Bogor. Hal ini sesuai dengan pernyataan Li *et al.* (2016) yang menyatakan



Gambar 1. Nukleotida identik pada gen *mcr-1* isolat *E. coli* DI15, *E. coli* K35d, SE DI15-12, dan SE DI15-13

bahwa sampel yang diambil dari provinsi yang sama memiliki kecenderungan genetik yang saling berhubungan. Kesamaan genetik pada wilayah yang berdekatan juga disampaikan oleh Matamoros *et al.* (2017) pada saat mengevaluasi jenis plasmid gen *mcr-1*.

Hasil analisis BLAST sebagaimana tersaji dalam Tabel 1 menunjukkan keempat sampel dengan panjang nukleotida 309 bp memiliki homologi nukleotida 100% terhadap tujuh referensi plasmid *E. coli* dan satu referensi *Klebsiella pneumoniae* yang berasal dari sampel hewan dan manusia dari beberapa negara. Ketujuh data plasmid referensi tersebut diambil dari data NCBI atau GenBank baik yang belum dipublikasikan atau yang telah dipublikasikan seperti oleh Li *et al.* (2018) dan Lv *et al.* (2018). Isolat referensi *E. coli* yang diisolasi dari manusia, ialah *E. coli* strain H17 plasmid pH17-1 (*Acc. no.* CP021194.1), *E. coli* strain EC1188 plasmid pEC1188-MCR (*Acc. no.* MH213346.1), *E. coli* strain H8 *E. coli* plasmid pMCR-H8 (*Acc. no.* CP029215.1), dan *E. coli* strain H9 *E. coli* plasmid pMCR-H9 (*Acc. no.* CP029184.1). Keempat *E. coli* tersebut berasal dari Cina dan diketahui melalui data di NCBI bahwa *E. coli* dengan *Acc. no.* CP029215.1 dan CP029184.1 merupakan dua isolat *E. coli* (*E. coli* strain H8 dan H9) yang berasal dari seorang peternak cerpelai. Adapun *E. coli* dengan *Acc. no.* MH213346.1 merupakan *E. coli* EC1188 yang

diisolasi dari urin pasien di rumah sakit (Li *et al.* 2018).

Homologi 100% juga ditemukan pada plasmid *E. coli* yang berasal dari hewan, yaitu *E. coli* strain PK105 plasmid pPK105 (*Acc. no.* MG808035.1), *E. coli* plasmid pmcr-JLF4 (*Acc. no.* MH176237.1), dan *E. coli* strain APECA2pJMA2 (*Acc. no.* MH208235.1). Isolat referensi *E. coli* dengan *Acc. no.* MG808035.1 merupakan *E. coli* strain PK105 yang diisolasi dari broiler sehat di Pakistan (Lv *et al.* 2018). Adapun *E. coli* *Acc. no.* MH176237.1 berasal dari sapi perah di Cina. Isolat referensi *E. coli* dengan *Acc. no.* MH208235.1 merupakan isolat *E. coli* strain APECA2 yang merupakan *E. coli* patogen ST68 dan isolat tersebut berasal dari broiler di Jerman. Homologi sekuen nukleotida *mcr-1* sampel uji juga ditemukan terhadap gen *mcr-1* bakteri *K. pneumoniae* di plasmid pHNAH25I (*Acc. no.* MH061196.1) yang berasal dari ayam di Cina. Apabila dilihat dari homologi nukleotida yang terdapat dalam Tabel 1, maka gen *mcr-1* sampel semuanya homolog dengan gen *mcr-1* yang berada dalam plasmid, tidak ada satu pun yang berasal dari kromosom.

Analisis selanjutnya adalah estimasi perbedaan evolusi nukleotida hasil sekuensing dengan menggunakan *software* MEGA7. Hasil analisis estimasi perbedaan evolusi sekuen tersaji dalam Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2 terlihat basa nu-

Tabel 1. Hasil analisis BLAST sampel *Escherichia coli* DI15, SE DI15-12, SE DI15-13, dan *E. coli* K35d terhadap referensi gen *mcr-1* di NCBI

No	Referensi dengan kemiripan tertinggi	Nomor <i>Accession</i> (<i>Acc. no.</i>)	Kemiripan (%)	Sumber sampel, negara, dan publikasi
1	<i>E. coli</i> strain H17 plasmid pH17-1	CP021194.1	100	Manusia, Cina (<i>Unpublished</i>)
2	<i>E. coli</i> strain EC1188 plasmid pEC1188-MCR	MH213346.1	100	Manusia, Cina (Li <i>et al.</i> 2018)
3	<i>E. coli</i> strain PK105 plasmid pPK105	MG808035.1	100	Broiler, Pakistan (Lv <i>et al.</i> 2018)
4	<i>E. coli</i> strain H8 <i>E. coli</i> plasmid pMCR-H8	CP029215.1	100	Manusia, Cina (<i>Unpublished</i>)
5	<i>E. coli</i> strain H9 <i>E. coli</i> plasmid pMCR-H9	CP029184.1	100	Manusia, Cina (<i>Unpublished</i>)
6	<i>E. coli</i> plasmid pmcr-JLF4	MH176237.1	100	Sapi perah, Cina (<i>Unpublished</i>)
7	<i>E. coli</i> strain APECA2 plasmid pJMA2	MH208235.1	100	Broiler, Jerman (<i>Unpublished</i>)
8	<i>K. pneumoniae</i> strain AHM7C25I plasmid pHNAH25I-MCR	MH061196.1	100	Ayam, Cina (<i>Unpublished</i>)

kleotida gen *mcr-1* antara empat sampel yang diuji tidak ada perbedaan atau 0%. Hal tersebut menunjukkan, nukleotida gen *mcr-1 E. coli* DI15, SE DI15-12, SE DI15-13, dan *E. coli* K35d tersebut 100% homolog untuk total panjang nukleotida 309 bp. Saat semua sampel yang diuji dibandingkan dengan *E. coli* strain SHP45 plasmid pHNSHP45 (*Acc. no.* KP347127) yang dilaporkan Liu *et al.* (2015) maka untuk total panjang nukleotida 309 bp tidak ada perbedaan nukleotida atau 100% homolog. Demikian pula apabila dibandingkan dengan gen *mcr-1 E. coli* pada plasmid pH17-1 (*Acc. no.* CP021194.1), pEC1188-MCR (*Acc. no.* MH213346.1), plasmid pA31-12 (*Acc. no.* KX034083.1), plasmid TN1 (*Acc. no.* LSBW01000090.1), plasmid pEC13-1 (*Acc. no.* CP016186.1), plasmid pPK105 (*Acc. no.* MG808035.1), dan plasmid pCDF8 (*Acc. no.* MF175191.1).

Sampel uji dengan panjang nukleotida gen *mcr-1* 309 bp memiliki perbedaan basa nukleotida antara 53% – 65% terhadap referensi gen *mcr-1 E. coli* dalam plasmid pPF11 (*Acc. no.* MF175186.1), plasmid pPC11 (*Acc. no.* MF175187.1), plasmid pKH457-3-BE (*Acc. no.* KU353730.1), plasmid pColR598_1 (*Acc. no.* MF175190.1), dan plasmid EC13 (*Acc. no.* JUJZ01000081.1). Kelima referen sekuen tersebut berasal dari sampel daging ayam di Swiss (*Acc. no.* MF175186.1 dan MF175187.1), sampel dari babi di Belgia (KU353730.1), sampel diare manusia di Swiss (MF175190.1), dan sampel air di Malaysia (JUJZ01000081.1).

Analisis pohon filogenik pada Gambar 3 menunjukkan empat sampel yang diuji terdapat dalam satu cabang dengan sekuen plasmid gen *mcr-1 E. coli* SHP45 (*Acc. no.* KP347127.1; tipe plasmid IncI2) yang pertama ditemukan oleh Liu *et al.* (2015). Isolat *E. coli* lainnya yang terdapat dalam satu cabang, yaitu *E. coli* dengan *Acc. no.* CP021194.1 (tipe plasmid tidak diketahui), *Acc. no.* MH213346.1 (tipe plasmid IncI2), *Acc. no.* MG808035.1 (tipe plasmid IncI2), *Acc. no.* KX034083.1 (tipe plasmid IncI2), *Acc. no.* LSBW01000090.1 (tipe plasmid IncHI2), *Acc. no.* CP016186.1 (tipe plasmid IncI2), dan *Acc. no.* MF175191.1 (tipe plasmid IncX4). Lima dari delapan isolat *E. coli* yang dalam satu cabang memiliki tipe plasmid yang sama yaitu IncI2. Sementara itu, referensi gen *mcr-1* yang telah berbeda cabang dari sampel adalah *E. coli* dengan *Acc. no.* MF175186.1 (tipe plasmid IncX4), *Acc. no.* MF175187.1 (tipe plasmid IncX4), *Acc. no.* MF175190.1 (tipe plasmid IncX4), *Acc. no.* KU353730.1 (tipe plasmid

IncFII), dan *Acc. no.* JUJZ01000081.1 (tipe plasmid IncI2). Tiga dari lima isolat yang berbeda cabang ini memiliki gen *mcr-1* dengan tipe plasmid IncX4.

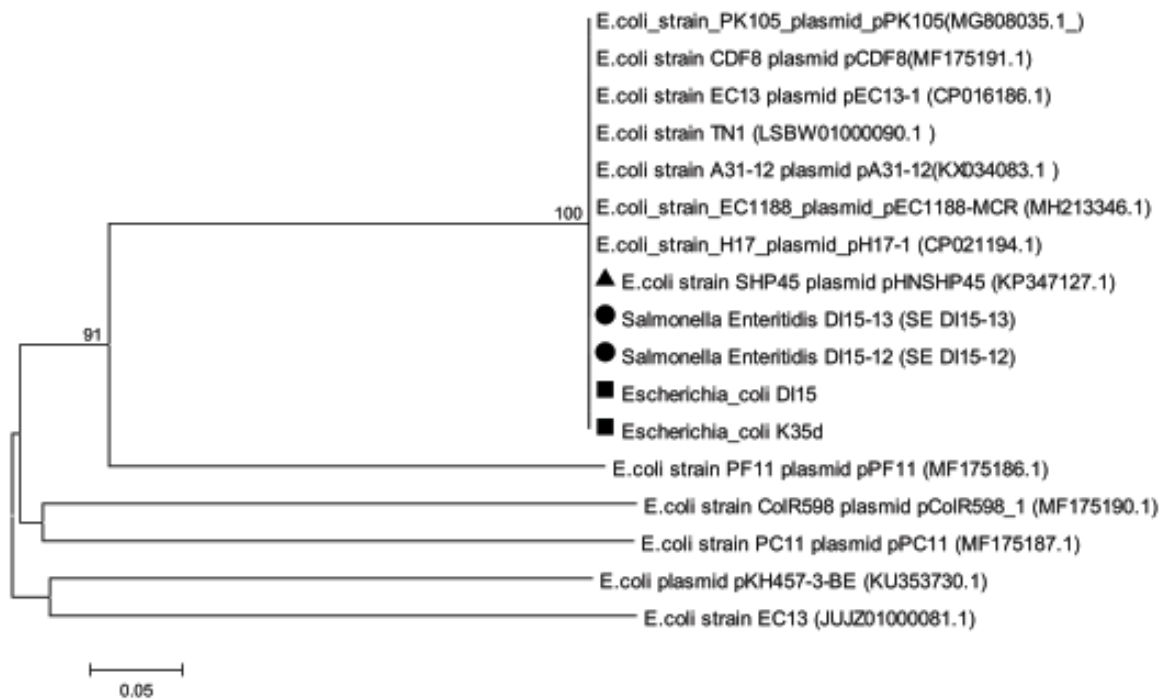
Berdasarkan estimasi perbedaan evolusi antarsekuen dan gambar pohon filogenik (Gambar 3) menunjukkan tidak terdapat perbedaan nukleotida (perbedaan 0%) antara sampel uji dan sekuen referensi gen *mcr-1* yang terdapat dalam tipe plasmid IncI2, IncHI2, dan IncX4. Adapun perbedaan basa nukleotida 53% – 65% (Gambar 2) ditemukan pada gen *mcr-1* yang terdapat dalam tipe plasmid IncI2, IncX4, dan IncFII. Hal ini bisa disebabkan karena gen *mcr-1* diketahui terdapat di 14 jenis tipe plasmid sehingga variasi hasil dengan evaluasi panjang nukleotida yang pendek (309 bp) dapat terjadi. Gen *mcr-1* pada sampel yang diuji menunjukkan tidak ada perbedaan dengan gen *mcr-1* yang ditemukan pertama kali oleh Liu *et al.* (2015). Gen *mcr-1* yang pertama kali ditemukan tersebut berada di tipe plasmid IncI2 (Matamoros *et al.* 2017). Apabila dilihat dari data tipe plasmid, maka nukleotida gen *mcr-1* dari sampel uji mayoritas memiliki homologi tinggi (perbedaan 0%) terhadap referen sekuen gen *mcr-1* dengan tipe plasmid IncI2, sedangkan perbedaan lebih besar terdapat dalam tipe plasmid IncX4.

Berdasarkan evaluasi gen *mcr-1* yang dilakukan oleh Matamoros *et al.* (2017) terhadap berbagai penelitian yang dilakukan terhadap gen *mcr-1* didapatkan bahwa 90.4% (198/219) plasmid yang membawa gen *mcr-1* masuk ke dalam tiga tipe plasmid berbeda, yaitu IncX4 (35.2%), IncI2 (34.7%), dan IncHI2 (20.5%). Apabila dilihat dari sebaran wilayah maka 65.8% tipe plasmid IncI2 berasal dari Asia dan 73.3% tipe plasmid IncHI2 berasal dari Eropa. Tipe plasmid IncX4 sebanyak 57.1% berasal dari Eropa, 37.7% dari Asia, dan 5.2% berasal dari daerah lain. Apabila dilihat dari sumber jenis sampel, maka sebaran gen *mcr-1* berdasarkan tipe plasmid tidak berbeda secara signifikan. Oleh sebab itu, hasil sekuensing gen *mcr-1* dari sampel yang diuji lebih cenderung pada tipe plasmid IncI2 dan variasi jenis sumber sampel cukup beragam. Selain itu, tidak menutup kemungkinan bahwa gen *mcr-1* dalam satu bakteri dapat tersebar dalam beberapa tipe plasmid. Perbedaan sebaran plasmid ini kemungkinan disebabkan karena perbedaan geografi, dimana geografi yang berdekatan memiliki kecenderungan kesamaan genetik (Li *et al.* 2016).

Berdasarkan hasil sekuensing didapatkan

No	Sampel dan <i>Escherichia coli</i> Referensi (GeneBank)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	<i>Escherichia coli</i> DI15																	
2	<i>Escherichia coli</i> K35d	0.00																
3	<i>Salmonella enteritidis</i> DI15-12 (SE DI15-12)	0.00	0.00															
4	<i>Salmonella enteritidis</i> DI15-13 (SE DI15-13)	0.00	0.00	0.00														
5	<i>E. coli</i> strain SHP45 plasmid pHNSHP45 (KP347127.1)	0.00	0.00	0.00	0.00													
6	<i>E. coli</i> strain HI7 plasmid pH17-1 (CP021194.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
7	<i>E. coli</i> strain EC1188 plasmid pEC1188-MCR (MH213346.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
8	<i>E. coli</i> strain A31-12 plasmid pA31-12 (KX034083.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
9	<i>E. coli</i> strain TN1 (LSBW01000090.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00									
10	<i>E. coli</i> strain EC13 plasmid pEC13-1 (CP016186.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00								
11	<i>E. coli</i> strain PK105 plasmid pPK105 (MG808035.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							
12	<i>E. coli</i> strain CDF8 plasmid pCDF8 (MF175191.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00						
13	<i>E. coli</i> strain PF11 plasmid pPF11 (MF175186.1)	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53					
14	<i>E. coli</i> plasmid pKH457-3-BE (KU353730.1)	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.60		
15	<i>E. coli</i> strain ColR598 plasmid pColR598_1 (MF175190.1)	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.67	0.65		
16	<i>E. coli</i> strain PC11 plasmid pPC11 (MF175187.1)	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.62	0.69	0.64	
17	<i>E. coli</i> strain EC13 (JUZ01000081.1)	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.71	0.61	0.65	0.67

Gambar 2. Estimasi perbedaan evolusi antar sekuens gen *mcr-1* dari *E. coli* DI15, *E. coli* K35d, SE DI15-12, dan SE DI15-13 terhadap beberapa referensi sekuens gen *mcr-1* di NCBI



Gambar 3. Pohon filogenik hasil sekuensing gen *mcr-1* *E. coli* DI15, *E. coli* K35d, SE DI15-12, dan SE DI15-13

Keterangan: (▲) *E. coli* yang pertama kali ditemukan adanya gen *mcr-1* oleh Liu et al. (2015), (●) isolat *S. Enteritidis* resipien gen *mcr-1*, (■) isolat *E. coli* resisten kolistin yang mengandung gen *mcr-1* (*E. coli* DI15 donor gen *mcr-1*)

bahwa sampel yang diuji memiliki homologi gen *mcr-1* dengan referen sekuens *Acc. no.* LSBW01000090.1 yang juga memiliki gen *mcr-1* dengan tipe plasmid IncHI2. Tipe plasmid IncHI2 merupakan elemen genetik yang bisa memediasi berbagai gen multiresistan. Berbagai

gen resisten dan elemen genetik dapat ditemukan dalam tipe plasmid ini, termasuk integron, IS, dan berbagai *cassettes* gen resisten (Li et al. 2016). Empat tipe *cassettes* genetik yang membawa gen *mcr-1* telah ditemukan dalam plasmid ini. Oleh sebab itu, dalam tipe plasmid

ini gen *mcr-1* dapat disisipkan ke berbagai *loci genetic plasmid*.

Berkenaan dengan multiresistan, isolat *E. coli* DI15 memiliki sifat resistan terhadap kolistin, amoksisilin, doksisisiklin, enrofloksasin, dan siprofloksasin (Palupi *et al.* 2019^b). Isolat *E. coli* DI15 pada saat uji konjugasi dengan *S. Enteritidis* ATCC 13076 tidak hanya memindahkan sifat resistan kolistin kepada bakteri donor, akan tetapi juga sifat resistan terhadap doksisisiklin (Palupi *et al.* 2019^b). Hal ini tidak menutup kemungkinan tipe plasmid untuk sampel yang diuji kemungkinan tipe plasmid IncI2 atau IncHI2, atau bisa saja keduanya. Evaluasi hasil sekuensing dari sampel yang diuji dalam penelitian ini memiliki keterbatasan karena menggunakan DNA sekuensing metode *sanger* yang menghasilkan panjang nukleotida yang terbatas sesuai dengan desain primer pada target gen yang digunakan yaitu 309bp. Oleh karena itu, untuk mengetahui lebih baik, maka sebaiknya dilakukan sekuensing secara *whole genomes* terhadap plasmid yang mengandung gen *mcr-1* dan gen resistan lainnya untuk lebih memastikan plasmid dan tipe plasmid dari isolat-isolat uji ini.

SIMPULAN

Hasil sekuensing gen *mcr-1* dari isolat *E. coli* DI15, *S. Enteritidis* DI15-12 (SE DI15-12), *S. Enteritidis* DI15-13 (SE DI15-13), dan *E. coli* K35d dengan panjang nukleotida 309 bp diketahui mempunyai homologi yang tinggi dengan data referen *mer-1* dari GenBank (NCBI) yang berada dalam plasmid. Adanya kesamaan materi genetik *mcr-1* dari bakteri donor dan bakteri resipien yang berbeda spesies serta kesamaan materi genetik *mcr-1* pada bakteri *E. coli* zoonosis merupakan ancaman yang serius bagi kesehatan manusia maupun hewan.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. 2019. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enteric* serotype Typhimurium isolate. *mBio*10: e00853-19.
- Carattoli A. 2009. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(6): 2227-2238
- 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>
- Hadjadj L, Riziki T, Zhu Y, Li J, Diene SM, Rolain JM. 2017. Study of *mcr-1* gene-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from humans and animals in different countries. *Genes.* 8: 394.
- Li A, Yang Y, Miao M, Chavda KD, Mediavilla JR, Xie X, Feng P, Tang Y-W, Kreiswirth BN, Chen L, Du H. 2016. Complete sequences of *mcr-1*-harboring plasmids from extended-spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60: 4351–4354.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R., Spencer J, Doi Y, Tian G, Domg 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.
- Lv J, Mohsin M, Lei S, Srinivas S, Wiqar RT, Lin J, Feng Y. 2018. Discovery of a *mcr-1*-bearing plasmid in commensal colistin-resistant *Escherichia coli* from healthy broilers in Faisalabad, Pakistan. *Virulence.* 9(1): 994-999.

- Matamoros S, van Hattem JM, Arcilla MS, Willemsse N, Melles DC, Penders J, Vinh TN, Hoa NT, de Jong MN, Schultsz C. 2017. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep.* 7: 15364.
- Palupi MF, Maheshwari H, Darusman HS, Sudarnika E, Wibawan IWT. 2018. Resistansi *Escherichia coli* terhadap kolistin sulfat dan deteksi gen *Mobilized Colistin Resistance-1* pada ayam pedaging akibat pemberian kolistin sulfat. *J Vet* (19)2: 196-207
- Palupi MF, Wibawan IWT, Sudarnika E, Maheshwari H, Darusman HS. 2019^a. Prevalence of *mcr-1* colistin resistant gene in *Escherichia coli* along the broiler meat supply chain in Indonesia. *Biotropia* (26)2: 143-153
- Palupi MF, Wibawan IWT, Sudarnika E, Maheshwari H, Rahayuningtyas I, Andhesfa E, Atikah N. 2019^b. Transfer Gen *Mobilized Colistin Resistance-1 (mcr-1)* dari *Escherichia coli* Resistan Kolistin ke *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Prosiding Penyidikan Penyakit Hewan Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah. Halaman 434-444
- Poirel L, Kieffer N, Brink A, Coetze J, Jayol A, Nordmann P. 2016. Genetic features of MCR-1-producing colistin-resistant *Escherichia coli* isolates in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother.* 60: 4394–4397.
- Sun J, Li XP, Yang R-S, Fang L-X, Huo W, Li S-M, Jiang P, Liao X-P, Liu Y-H. 2016. Complete nucleotide sequence of an IncI2 plasmid coharboring *bla*_{CTX-M-55} and *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60: 5014–5017.
- Sun J, Li XP, Fang LX, Sun RY, He YZ, Lin J, Liao XP, Feng Y, Liu YH. 2018. Co-occurrence of *mcr-1* in the chromosome and on an IncHI2 plasmid: persistence of colistin resistance in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 51(6): 842-847.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution.* <http://www.kumarlab.net/publications> [12 Desember 2018]
- 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.
- Veldman K, van Essen-Zandbergen A, Rapallini M, Wit B, Heymans R, van Pelt W, Mevius D. 2016. Location of colistin resistance gene *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from livestock and meat. *J Antimicrob Chemother.* 71(8): 2340-2342.
- [WHO] World Health Organization. 2017. Critically important antimicrobials for human medicine – 5th rev. WHO. Switzerland. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Pp:12-37
- Zurfluh K, Nüesch-Inderbinnen M, Klumpp J, Poirel L, Nordmann P, Stephan R. 2017. Key features of *mcr-1*-bearing plasmids from *Escherichia coli* isolated from humans and food. *Antimicrob Resist Infect Control.* 6: 91.