

Perkembangan Resistensi *Escherichia coli* terhadap Oksitetrasiklin

Resistance Development of *Escherichia coli* towards Oxytetracycline

Soedarmanto Indarjulianto¹, Alfarisa Nururrozi¹, Yanuartono¹, Rusmihayati¹,
Sitarina Widyarini^{2*}, Puspa Wikan Sari³, Vembriarto Jati Pramono⁴

¹Departemen Ilmu Penyakit Dalam, ²Departemen Patologi, ³Departemen Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jl. Fauna No 2, Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Indonesia

⁴Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan
Kantor Pusat Kementan Gedung C Lt. 9, Jln. Harsono RM, No. 3, Ragunan,
Pasar Minggu, Jakarta Selatan, 12550

*Email: sitarina.widyarini@gmail.com

Naskah diterima : 24 Februari 2017, direvisi : 17 Mei 2018, disetujui : 30 Mei 2018

Abstract

Antimicrobial resistance is amongst the primary concern in the field of veterinary medicine worldwide. The research was conducted to evaluate the resistance of *Escherichia coli* due to inappropriate antibiotic treatment. *Escherichia coli* in this research was cultured in vitro using 5-ml Tryptone Soya Broth (TSB), which was mixed with an antibiotic, then was incubated at 37 °C for four days (stage I). Subsequently, a part of the culture was transferred into another 5-ml TSB and incubated at 37 °C for four days (stage II). This procedure was undertaken continuously for stage III, IV, V, and VI (until day 24). Antibiotics in this research was Oxytetracycline with three various doses, which are lower dose (1 mg/ml), normal dose (2 mg/ml), and higher dose (8 mg/ml). The development of the antimicrobial resistance was evaluated every four days, using disk diffusion method and the data were analysed descriptively. The results showed that the normal and higher doses of Oxytetracycline has the same rate (day 16) in causing *E. coli* resistant to Oxytetracycline. Therefore, the treatment of Oxytetracycline with a normal and higher doses continuously could accelerate the emergence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*.

Key words: antibiotic resistance, *Escherichia coli*, oxytetracycline

Abstrak

Resistensi terhadap antibiotika merupakan masalah yang penting dalam dunia Kedokteran Hewan. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi terjadinya sifat resistensi *E. coli* terhadap antibiotika berkaitan dengan penggunaan antibiotika yang kurang tepat. *E. coli* asal ayam dengan diagnosa Colibacillosis ditumbuhkan pada media 5 ml *Tryptone Soya Broth* (TSB) mengandung antibiotik, diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari (tahap I), kemudian sebagian kultur ditransfer ke 5 ml TSB yang baru, diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari (tahap II). Langkah yang sama dilanjutkan untuk tahap III, IV, V dan VI (sampai 24 hari). Antibiotik yang digunakan adalah Oksitetrasiklin dengan dosis 1 mg/ml (dosis lebih rendah), 2 mg/ml (dosis standar), dan 8 mg/ml (dosis lebih tinggi). Perkembangan sifat resistensi bakteri terhadap antibiotika dievaluasi setiap 4 hari menggunakan metode difusi cakram dan hasilnya dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Oksitetrasiklin, dosis standar dan lebih tinggi mampu menyebabkan terbentuknya sifat resistensi *E. coli* pada waktu yang sama (hari ke-16). Dari hasil ini menunjukkan bahwa menggunakan Oksitetrasiklin dosis standar dan lebih tinggi secara terus menerus memicu terjadinya resistensi *E. coli* terhadap antibiotik tersebut.

Kata kunci: resistensi terhadap antibiotika, *Escherichia coli*, oksitetrasiklin

Pendahuluan

Resistensi bakteri terhadap antibiotika merupakan masalah yang semakin penting dalam dunia Kedokteran Hewan. Resistensi bakteri terhadap antibiotika adalah kemampuan bakteri untuk tetap

hidup ketika diberikan pengobatan antibiotika. Sifat resistensi ini dapat terjadi terhadap hanya satu antibiotika tertentu ataupun lebih dari satu antibiotika yang disebut sebagai multi resisten terhadap antibiotika (Soedarmanto *et al.*, 2011; Tadesse *et al.*,

2012).

Di bidang peternakan ayam broiler, antibiotika banyak digunakan untuk pengobatan penyakit bakterial maupun dipakai sebagai *growth promoter*. Antibiotika dalam pengobatan biasanya diberikan dalam waktu 3-5 hari berturut-turut sesuai dosis anjuran. Walaupun demikian, penggunaan antibiotika untuk tujuan pengobatan sering diberikan dalam jangka waktu melebihi anjuran. Penggunaan antibiotika yang irasional termasuk pemberian dengan dosis yang tidak sesuai anjuran, kemungkinan akan berpengaruh terhadap terjadinya resistensi. Pemberian antibiotika dari golongan yang sama secara terus-menerus dalam waktu yang lama juga akan memicu terjadinya resistensi. Kontrol penuh penggunaan antibiotika dapat menjadi faktor signifikan dalam mengurangi terjadinya resistensi bakteri terhadap antimikroba (Jelena *et al.*, 2006; Lolo *et al.*, 2006). Penggunaan antibiotika yang berlebihan dan non-selektif akan meningkatkan kemampuan bakteri untuk bertahan hidup dan memicu munculnya resistensi bakteri terhadap antibiotika (Mcewen dan Fedorka-Cray, 2002; Stitzel dan Craig, 2005).

Escherichia coli adalah bakteri yang sering ditemukan sebagai penyebab penyakit menular pada peternakan ayam sebagai penyebab Colibacillosis (Dziva dan Stevens, 2008). Oksitetrasiklin adalah antibiotika yang sering dan secara luas digunakan dalam pengobatan kasus Colibacillosis maupun penyakit bakterial lainnya pada unggas. Penggunaan oksitetrasiklin pada ayam biasanya diberikan per oral dalam bentuk cair (dicampur dalam air minum) dengan dosis 2mg/ml air minum, selama 3-5 hari (Hintono *et al.*, 2007). Antibiotika tersebut mempunyai risiko potensial terhadap terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotika yang berdampak terhadap kesehatan hewan dan manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi periode waktu munculnya resistensi *E. coli* terhadap Oksitetrasiklin akibat

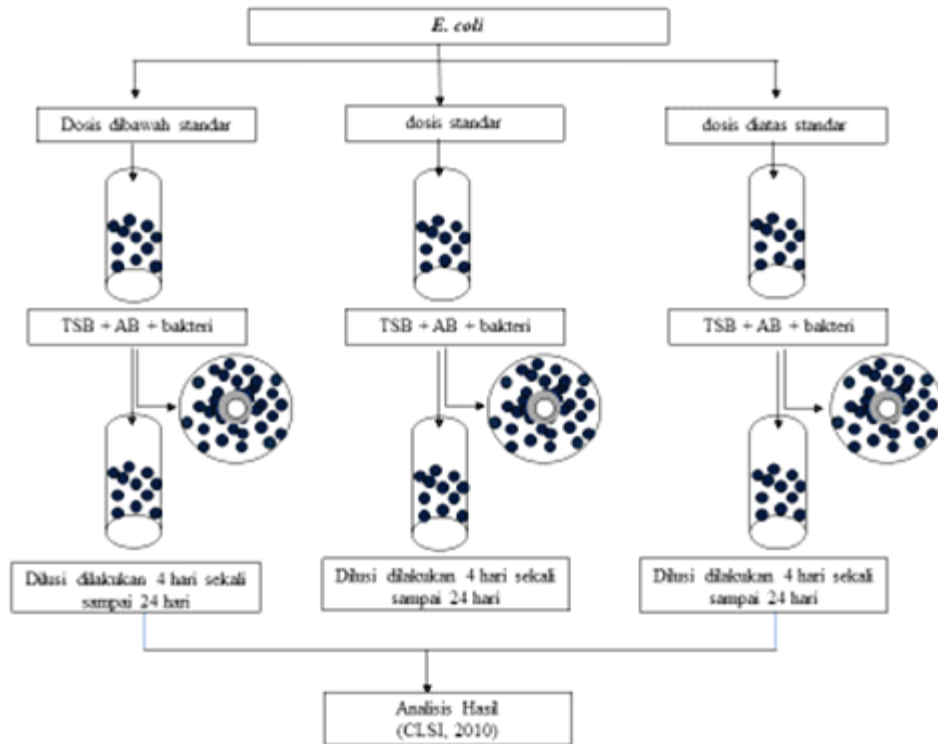
pemberian antibiotika tersebut dengan dosis dan waktu yang tidak sesuai secara *in vitro*.

Materi dan Metode

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* dari kasus Colibacillosis ayam broiler. Isolat merupakan koleksi biakan murni Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Identifikasi ulang isolat bakteri dilakukan menurut Quinn *et al.*, (2011) kemudian dilakukan *sensitivity test* terhadap Oksitetrasiklin secara difusi cakram. Koloni bakteri sebanyak 0,5 McFarland (CLSI, 2010) disebar merata pada plat *Mueller Hinton Agar* (MHA, Oxoid, Inggris), lalu kertas cakram mengandung Oksitetrasiklin 30 µg (Oxoid, Inggris) diletakkan di atas koloni, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Lee dan Lawrence, 1998). Diameter zona terang yang terbentuk di sekitar cakram antibiotika pada MHA diukur dalam satuan milimeter dan dibandingkan standar untuk menentukan kerentanan atau resistensi dari isolat (CLSI, 2010).

Penentuan waktu terbentuknya sifat resistensi dilakukan menurut Lee dan Lawrence, (1998) dengan modifikasi. Isolat *E. coli* ditanam dalam 5 ml *Tryptone Soya Broth* (TSB) yang mengandung Oksitetrasiklin 1 mg/ml (dosis di bawah standar), 2 mg/ml (dosis standar), dan 8 mg/ml (dosis di atas standar), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari. Pada hari ke 4, masing-masing biakan dilakukan *sensitivity test* terhadap Oksitetrasiklin 30 µg (Oxoid, Inggris) menggunakan difusi cakram. Prosedur ini diulang sebanyak 6 kali (total 24 hari perlakuan) (Gambar 1).

Hasil pengukuran zona terang ditentukan sebagai rentan ketika diameter zona penghambatan \geq 15 mm, intermedier 12-14 mm dan resisten \leq 11 (CLSI, 2010).



Gambar 1. Bagan alur penentuan waktu terbentuknya sifat resistensi *E. coli* terhadap Oksitetrasiklin.

Hasil dan Pembahasan

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia menurut Quinn *et al.*, (2011) adalah *E.coli*. Uji sensitivitas sebelum perlakuan menunjukkan bahwa *E. coli* yang dipakai sensitif terhadap Oksitetrasiklin. Perlakuan kelompok dosis di bawah standar (1 mg/ml) menunjukkan perubahan sifat bakteri dari sensitif menjadi intermedier pada akhir perlakuan V (hari ke - 20) hingga akhir perlakuan (hari ke - 24). Sedangkan pada kelompok dosis standar (2 mg/ml) dan dosis di atas standar (8 mg/ml), *E.coli* menunjukkan perubahan

sifat dari sensitif menjadi intermedier pada akhir perlakuan III (hari ke-12), dan menjadi resisten pada akhir perlakuan IV (hari ke-16) (Tabel).

Penelitian ini mengungkapkan bahwa pemberian Oksitetrasiklin secara terus menerus menyebabkan terbentuknya sifat resistensi *E.coli* terhadap antibiotika tersebut. Sifat resistensi terhadap Oksitetrasiklin terjadi pada hari ke-16 ketika *E. coli* diberi perlakuan dengan dosis 2 mg/ml dan dosis 8 mg/ml, sementara resistensi tidak teramati ketika diberi perlakuan dengan dosis 1 mg/ml sampai hari ke-24.

Tabel. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *E. coli* terhadap Oksitetrasiklin.

Grup	Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri (mm) pada hari ke-					
	4	8	12	16	20	24
Dosis di bawah standar (1 mg/ml)	22 (S)	23 (S)	21 (S)	20 (S)	14 (I)	14 (I)
Dosis standar (2 mg/ml)	23 (S)	20 (S)	14 (I)	11 (R)	11 (R)	11 (R)
Dosis di atas standar (8 mg/ml)	22 (S)	23 (S)	14 (I)	11 (R)	11 (R)	11 (R)

Keterangan : S: Sensitif; I: Intermedier; R: Resisten.

Secara umum sensitivitas *E. coli* menurun ketika diberi perlakuan Oksitetrasiklin berbagai dosis selama 24 hari. Resistensi mungkin terjadi karena paparan jangka panjang terhadap antibiotika (Plumb, 1999; Arias dan Murray, 2009). Penggunaan antimikrobia konsentrasi rendah dapat menyebabkan sifat bakteri patogen berkembang menjadi resisten terhadap antimikroba (Bradbury dan Munroe, 1985). Jetacar (1999) melaporkan bahwa bakteri patogen yang resisten terhadap antimikroba asal hewan dapat mentransfer gen resistensi antimikroba mereka ke bakteri manusia, misalnya *E. coli* melalui rantai makanan atau kontak langsung (WHO, 1997; Van Den Bogaard dan Stobberingh, 1999; Butaye et al., 2003).

Resistensi bakteri terhadap antibiotika dapat terjadi antara lain akibat dosis yang tidak sesuai, pengobatan yang tidak tuntas, pemberian antibiotik dari golongan yang sama secara terus-menerus dalam waktu yang lama, dan kemampuan bakteri itu sendiri. Menurut Peleg dan Hooper (2010) beberapa mekanisme resistensi antibiotik pada bakteri Gram-negatif yaitu: (1) resistensi dengan menutup retakan atau pori-pori pada dinding sel bakteri, sehingga mengurangi jumlah antibiotika yang melintasi membran sel; (2) meningkatkan produksi betalactamase periplasmik, sehingga merusak struktur beta-laktam; meningkatkan output pompa (*efflux pump*) di transmembran, sehingga bakteri dapat mengekskresikan obat sebelum terjadi efek apapun; modifikasi enzim yang menyebabkan antibiotika kehilangan kemampuan untuk berinteraksi dengan situs target; mutasi situs target, dengan demikian menghambat kerja antibiotika; (3) modifikasi atau mutasi ribosom, sehingga mencegah interaksi dengan antibiotik yang menghambat sintesis protein bakteri; (4) *bypass* metabolisme, suatu jalur alternatif dari efek penghambatan enzim pada antibiotik; dan (5) mutasi pada lipopolisakarida sehingga antibiotik tidak dapat mengikat target (antibiotik polimiksin).

Penentuan sifat resistensi *E. coli* yang terbentuk terhadap Oksitetrasiklin bersifat sementara atau definitif memerlukan penelitian lebih lanjut. Sifat resistensi bakteri terhadap antibiotika dapat dikode oleh gen yang berada di dalam plasmid ataupun kromosom DNA (Soedarmanto et al., 1995; Bennett, 2008). Oleh karena itu, pelacakan gen yang kemungkinan mengkode sifat resistensi *E. coli* terhadap Oksitetrasiklin pada penelitian ini sangat diperlukan.

Kesimpulan

Penggunaan Oksitetrasiklin dosis standar dan di atas standar secara terus menerus memicu terjadinya resistensi *E. coli*.

Daftar Pustaka

- Arias, C.A. and Murray, B.E. 2009. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century A clinical super-challenge. *N. Engl. J. Med.* 360; 5: 349-443.
- Bennett, PM. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria (Review). *British J. of Pharmacol.* 153: S347-S357.
- Bradbury, W.C. and Munroe, D.L.G.. 1985. Occurance of plasmids and antibiotic resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy and diarrheic animals. *J. Clin. Microbiol.* 22: 339-346.
- Butaye, P., Devriese, L.A. and Hasebrouck, F. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive. *Bact. Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2): 175-188.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA.
- Dziva, F. and Stevens, MP. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*

- in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37(4):355-366.
- Hintono, A., Astuti, M., Wuryastuti, H. dan Rahayu, ES. 2007. Pengaruh peningkatan zat besi ransum dan pemberian oksitetrasiklin pada ayam terhadap kandungan residu oksitetrasiklin dan aktivitasnya dalam telur. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 32 (4): 245-250.
- Jelena. P., Baltic, M. Cupic, V. Stefanovic, S. and Dragica, S. 2006. Residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. *Acta Vet.* (Beograd), 56: 497-506.
- Jetacar (Joint Expert Advisory Committee On Antibiotic Resistance) Australia. 1999. The use antibiotic in food producing animals: Antibiotic resistance bacteria in animals and humans. Commonwealth of Australia.
- Lee, M.D. and Lawrence, H.A. 1998. Colibacillosis. In A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogen. American Association of Avian Pathologist. Fourth ed. Pennsylvania: pp: 14–16.
- Lolo, M., Pedreira, S. Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A. and Fente, C. 2006. Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue. *Food Add. Contam.* 23: 988-993.
- McEwen, S.A. and Fedorka-Cray, P.J. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34 (Suppl 3): 93–106.
- Peleg, A.Y. and Hooper, D.C. 2010. Current concepts, hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* 362:1804-1013.
- Plumb, D.C. 1999. *Veterinary Drug Handbook.* IowaState University Press, Ames.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. and Hartigan, P.J. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Wiley-Blackwell, 2nd ed.
- Soedarmanto, I., Kanbar, T., Ülbegi-Mohyla, H., Hijazin, M., Alber, J., Lämmner, C., Akineden, O., Weiss, W., Moritz, A., and Zschöck, M. 2011. Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. *Res. Vet. Sci.* 91, Pp e-25-e27.
- Soedarmanto, I., Schwarz, S., Liebisch, B., Lämmner, C. 1995. Tetracycline resistance determinants among streptococci of serological group G and L. *Vet Microbiol.* 45(4):331-337.
- Stitzel, R. E and Craig, C. R. 2005. *Modern Pharmacology.* IowaState University Press, Ames.
- Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J. and Mc Dermott, P. F. 2012. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 18(5): 741-749.
- Van Den Bogaard and Stobberingh, A.E. 1999. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs.* 58(4): 589–607.
- WHO. 1997. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals: report and proceedings of a WHO meeting. 13 – 17 October. Berlin. WHO. Geneva. 28.