

RESISTANSI *ESCHERICHIA COLI* AKIBAT PEMBERIAN KOLISTIN SULFAT SECARA *IN VITRO*

Maria Fatima Palupi¹, I Wayan T. Wibawan³, Hera Maheshwari², Huda S. 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 Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University

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

ABSTRAK

Pemberian antimikrob dengan dosis dibawah konsentrasi hambat minimum ditengarai sebagai pemacu terjadinya resistansi pada mikrob. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mekanisme resistansi pada *Escherichia coli* yang dipapar dengan kolistin sulfat secara *in vitro*. Isolat yang digunakan adalah *Escherichia coli* NIHJ dalam waktu dan *E. coli* ATCC 25922 dipapar dengan kolistin sulfat dibawah konsentrasi hambat minimalnya. Dalam waktu 4 hari, konsentrasi hambat minimum *E. coli* meningkat dari 1,3 ug/mL menjadi > 2 ug/mL atau menjadi resistan. *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam dua hari setelah terpapar kolistin sulfat dibawah nilai MICnya menjadi resistan. Hal ini menunjukkan adanya mekanisme resistansi akibat mutasi yang dipacu oleh pemberian kolistin sulfat dibawan nilai MIC.

Kata kunci: resistansi, mutasi, colistin, *Escherichia coli*

ABSTRACT

The administration of antimicrobials at doses below the minimum inhibitory concentration (MIC) is suspected to be a trigger for the occurrence of resistance to microbes. This study aims to determine the mechanism of resistance in *Escherichia coli* exposed to colistin sulfate *in vitro*. The isolates used were *Escherichia coli* NIHJ in time and *E. coli* ATCC 25922 exposed to colistin sulfate under its MIC value. Within 4 days, the minimum inhibitory concentration of *E. coli* increased from 1,3 ug/mL to > 2 ug/mL or became resistant. *Escherichia coli* ATCC 25922 within two days after exposure to colistin sulfate below the MIC value becomes resistant. This shows the existence of resistance mechanisms due to mutations that are triggered by the administration of colistin sulfate under MIC values.

Keywords: resistance, mutation, colistin, *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Resistensi antimikrob merupakan kemampuan mikrob untuk hidup meskipun terdapat agen atau suatu bahan yang secara spesifik digunakan untuk membunuh mikrob tersebut. Resistensi antimikrob merupakan suatu hasil dari mekanisme mikrob untuk mengurangi atau menghilangkan efektifitas suatu obat, bahan kimia, atau bahan yang lain yang berfungsi untuk menyembuhkan atau mencegah infeksi yang disebabkan oleh mikroba tersebut⁽¹²⁾.

Mekanisme resistensi antimikrob secara garis besar dibagi dua yaitu mekanisme *intrinsic/ innate* dan perolehan⁽¹⁾. Mekanisme *intrinsic/ innate* antara lain (1) bakteri mampu memproduksi enzim-enzim yang mampu menghancurkan agen antimikrob sebelum mencapai target atau memodifikasi obat sehingga tidak lagi dikenali oleh target, (2) dinding bakteri menjadi *impermeable* terhadap agen antimikrob, (3) posisi target diubah melalui mutasi sehingga tidak lagi bisa berikatan dengan agen antimikrob, (4) bakteri melakukan *efflux pump* sehingga mengeluarkan agen antimikrob dari dalam sel sebelum agen tersebut mencapai target, dan (5) jalur metabolisme spesifik pada bakteri secara genetik diubah sehingga agen antibiotika tidak dapat menimbulkan efek yang diharapkan.

Mekanisme resistensi melalui perolehan/*acquire* antara lain dengan cara mutasi, konjugasi, transformasi, transduksi, dan transposisi⁽¹⁾. Mutasi dapat terjadi adanya kromosom resistan terjadi akibat mutasi spontan pada lokus yang mengatur kepekaan pada antimikrob yang diberikan. Mutasi spontan terjadi saat diberikan antimikrob dengan frekuensi rendah, hingga saat bakteri terpapar dengan antimikrob tersebut, maka bakteri yang mutan akan bertahan. bakteri yang bertahan akan berkembang biak. Mutasi spontan juga dapat terjadi di plasmid.

Bakteri sering kali mengandung elemen *genetic extra chromosomal* atau plasmid yang membawa gen resistan. Saat dua sel bakteri

sangat berdekatan, mereka akan membentuk struktur seperti jembatan/pilus antar keduanya. Pilus ini menghubungkan mereka dan terjadi *copy plasmid*, yang berpindah dari satu sel ke lainnya. Mekanisme ini disebut sebagai konjugasi. Adapun mekanisme transformasi terjadi dengan cara bakteri memasukkan *naked* fragment DNA yang membawa gen resistan. Fragmen-fragmen DNA dibawa masuk ke sel melalui proses yang disebut transformasi. Fragmen DNA menyesuaikan ke kromosom sel bakteri hospes melalui rekombinan dan menyebabkan sel menjadi resistan.

Mekanisme transduksi melalui saat *bacteriophage* bermultiplikasi dalam sitoplasma bakteri, fragmen DNA dari plasmid atau kromosom dapat masuk ke *coat* virus dan masuk ke sel hospes lainnya. Jika fragmen tersebut mengandung gen resistan, maka hospes selanjutnya dapat menjadi resistan. Adapun mekanisme transposisi melalui transposon atau *sequence bergerak/ mobile* yang memiliki kemampuan berpindah dari area kromosom dan plasmid satu ke area yang lain.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui mekanisme resistensi *Escherichia coli* akibat pemaparan kolistin sulfat. Kolistin sulfat merupakan obat yang sangat penting bagi manusia karena polimiksin bisa menjadi satu-satunya terapi yang tersedia untuk beberapa infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif, misalnya infeksi yang berkenaan dengan *multidrug-resistant Acinetobacter species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae multidrug-resistant carbapenemase*^(3, 4, 6, 11).

MATERI DAN METODE

Escherichia coli NIHJ dan *E. coli* ATCC 25922 digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian kolistin sulfat secara *in vitro*. Nilai konsentrasi hambat minimal (KHM) awal *E. coli* NIHJ dan *E. coli* ATCC 25922 ditentukan dengan menggunakan uji kepekaan dengan metode *agar dilution*. Media yang digunakan adalah *Mueller-Hinton agar* (MHA, DB/Difco-

FRA) yang mengandung konsentrasi kolistin sulfat dari 0.1 µg/mL hingga 2 µg/mL. Setelah diketahui nilai KHM, *E. coli* ATCC 25922 dan *E. coli* NIHJ ditanam pada media MHA yang mengandung kolistin sulfat dengan konsentrasi terakhir di mana *E. coli* tersebut dapat tumbuh dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. *Escherichia coli* NIHJ dan *E. coli* ATCC 25922 yang tumbuh kemudian diuji kepekaannya terhadap kolistin sulfat dengan menggunakan metode *agar dilution*⁽²⁾. Prosedur ini diulang terus hingga didapatkan nilai KHM > 2 µg/mL. Penelitian ini dilaksanakan di unit Farmasetik dan Premiks, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH).

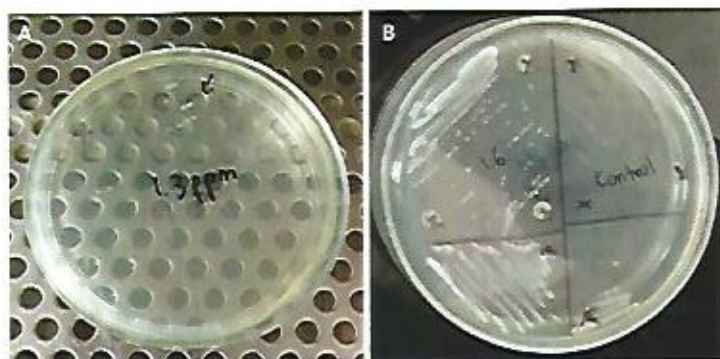
HASIL DAN PEMBAHASAN

Escherichia coli NIHJ merupakan *E. coli* standar yang digunakan untuk uji potensi kolistin di BBPMSOH. Adapun *E. coli* ATCC 25922 merupakan *E. coli* standar atau kontrol negatif pada uji kepekaan *Enterobacteriaceae* terhadap antimikrob⁽²⁾.

Berdasarkan hasil uji, didapatkan nilai KHM kolistin sulfat *E. coli* NIHJ awal adalah 1.3 µg/mL. Isolat *E. coli* NIHJ yang tumbuh pada MHA dengan konsentrasi kolistin sulfat 1.2 µg/mL kemudian ditanam pada MHA dengan konsentrasi kolistin sulfat 1.3 µg/mL dengan menggunakan metode *agar dilution*, dan setelah diinkubasi semalam ternyata terdapat pertumbuhan sebagaimana Gambar 1A.

Isolat yang mampu tumbuh tersebut kemudian ditanam pada media MHA dengan konsentrasi kolistin sulfat 1,4 µg/mL, 1,5 µg/mL, dan 1,6 µg/mL. Setelah diinkubasi didapatkan isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi kolistin sulfat 1,4 µg/mL dan 1,5 µg/mL. Akan tetapi, tidak ada pertumbuhan pada MHA dengan konsentrasi kolistin sulfat 1,6 µg/mL atau terjadi peningkatan kemampuan KHM menjadi 1,6 µg/mL. Selanjutnya, koloni yang tumbuh di MHA yang mengandung kolistin sulfat 1,5 µg/mL ditanam dalam MHA dengan konsentrasi kolistin sulfat 1,6 µg/mL, 1,7 µg/mL, 1,8 µg/mL, 1,9 µg/mL, dan 2 µg/mL. Setelah diinkubasi selama 24 jam, didapatkan bahwa terdapat pertumbuhan *E. coli* NIHJ pada media MHA dengan konsentrasi 2 µg/mL (Gambar 1B).

Pada saat dilakukan uji kepekaan, didapatkan bahwa *E. coli* NIHJ yang ditanam terakhir pada MHA yang mengandung 1,5 µg/mL memiliki KHM > 2 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa pemaparan terus-menerus *E. coli* dengan kolistin sulfat dengan dosis di bawah nilai KHM dapat memunculkan *E. coli* yang resistan terhadap kolistin sulfat. Pada penelitian ini menunjukkan terdapat peningkatan kemampuan KHM dari *E. coli* NIHJ dari awalnya 1,3 µg/mL, kemudian meningkat menjadi 1,6 µg/mL, dan setelah dipapar dengan terus menerus secara bertingkat dengan konsentrasi dibawah KHM maka dalam waktu empat hari untuk mendapatkan koloni *E. coli* NIHJ yang menjadi resistan terhadap kolistin sulfat.



Gambar 1 Pemaparan kolistin sulfat pada *Escherichia coli* NIHJ. (A) *Escherichia coli* NIHJ yang tumbuh di MHA dengan konsentrasi kolistin sulfat 1,3 µg/mL. (B) *Escherichia coli* NIHJ yang sudah mampu tumbuh di MHA dengan konsentrasi kolistin sulfat 2 µg/mL.

Pada uji resistansi kolistin sulfat dengan menggunakan *E. coli* ATCC 25922, didapatkan nilai KHM awal adalah 0,6 µg/mL. Isolat yang tumbuh di media MHA dengan kandungan kolistin 0,5 µg/mL atau memiliki KHM 0,6 µg/mL kemudian ditanam pada MHA yang mengandung kolistin sulfat 0,5 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,7 µg/mL, 0,8 µg/mL, 9 µg/mL dan 1 µg/mL. Ternyata isolat berhasil tumbuh pada MHA yang mengandung kolistin sulfat 1 µg/mL. Isolat yang terpapar kolistin sulfat 0,5 µg/mL dan 1 µg/mL kemudian diuji kepekaannya dengan menggunakan kontrol *E. coli* ATCC 25922 awal. Pada saat diuji tiga kali, *E. coli* ATCC 25922 yang terpapar kolistin sulfat 0,5 µg/mL menunjukkan dua isolat resistan dengan nilai KHM 4 µg/mL. Adapun *E. coli* ATCC 25922 yang terpapar dengan kolistin sulfat 1 µg/mL menunjukkan semuanya resistan, dua isolat memiliki nilai KHM 4 µg/mL dan satu isolat memiliki KHM 8 µg/mL.

Sebagaimana *E. coli* NIHJ, pada penelitian dengan menggunakan *E. coli* ATCC 25922 juga menunjukkan bahwa paparan kolistin sulfat konsentrasi di bawah nilai KHM akan menyebabkan bakteri bermutasi dengan meningkatkan kemampuannya bertahan terhadap kolistin sulfat. Pada saat nilai KHM selanjutnya berada di atas nilai KHM awal dan di bawah nilai konsentrasi *mutant prevention concentration*, maka bisa muncul isolat yang resistan yang disebut mutasi *single step* (7,9). Penelitian *in vitro* dengan menggunakan *E. coli* NIHJ dan *E. coli* ATCC 25922 menunjukkan hal tersebut.

Salah satu mekanisme resistansi bakteri terhadap kolistin adalah disebabkan oleh perubahan di membran karena mutasi bakteri yang secara teori tidak bisa melalui *mobile genetic element* (6,8). Resistansi polimiksin dimediasi oleh mutasi pada *regions* yang spesifik, yaitu *pmrA/B* dan *phoP/Q* (10). Resistansi juga berhubungan dengan perubahan struktur lipopolisakarida (*system ParR-ParS*) pada sitosol dan periplasmik membran sel yang merupakan hasil adaptasi dari resistansi akibat pemberian konsentrasi kolistin di bawah nilai KHM (5).

Hasil penelitian ini membuktikan adanya mutasi atas kemampuan *E. coli* NIHJ dan *E. coli* ATCC 25922 yang tadinya tidak resistan terhadap kolistin bisa menjadi resistan terhadap kolistin akibat paparan terus menerus kolistin sulfat dibawah nilai KHM. Sifat kolistin yang tidak mudah diserap disaluran pencernaan, sangat memungkinkan terjadi kontak langsung antara kolistin dan *E. coli* komensal di saluran pencernaan. Oleh sebab itu, penggunaan kolistin sulfat yang lama dengan konsentrasi rendah dapat memacu mutasi dari bakteri untuk meningkatkan nilai KHMnya. Peningkatan nilai KHM disertai paparan kolistin dibawah nilai KHM dapat meningkatkan nilai KHM hingga menjadi resistan. Mengingat posisi kolistin yang sejak tahun 2017 dimasukkan dalam daftar *Critically High Important Antimicrobials for Human*, maka penggunaan kolistin yang bijak dan tepat untuk hewan produksi sangat diperlukan.

KESIMPULAN

Paparan kolistin sulfat di bawah nilai KHM secara terus-menerus dan bertingkat dapat memacu mutasi *E. coli* menjadi resistan terhadap kolistin sulfat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cavalieri SJ, Harbeck R, McCarter YS, Ortez JH, Rankin ID, Sautter RL, Sharp SE, Spiegel CA. 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology
2. Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI]. 2016. M100S: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 26th Ed. CLSI. USA
3. Collinon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, and 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* 2009:49 (1 July): 132-141
4. Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram negative bacterial infection. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1333-41. [Internet] [Diunduh pada 2 September 2016) Terdapat dalam <http://dx.doi.org/10.1086/429323>
5. Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. 2010. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(8):3372-82. doi: 10.1128/AAC.00242-10.
6. European Medicine Agency [EMA]. 2013. Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. 7 Westferry Circus Canary Wharf London E14 4HB United Kingdom. [Internet] [Diunduh tanggal 24 Februari 2016]. Terdapat dalam http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/07/WC500146813.pdf
7. Gebru E, Choi MJ, Lee SJ, Damte D, Park SC. 2011. Mutant prevention concentration and mechanism of resistance in clinical isolates and enrofloxacin/ marbofloxacin-selected mutants of *Escherichia coli* of canine origin. *J Med Microbiol*. 60(Pt10):1512-1522. doi:10.1099/JMM.0.028654-0
8. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. 2006. Colistin: The re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. (6):589-601
9. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. 2005. Standardization of pharmacokinetic/ pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J Antimicrob Chemother*. 55:601-607. doi.org/10.1093/jac/dki079
10. Moskowitz, S.M., M.K. Brannon, N. Dasgupta, M. Pier, N. Sgambati, A.K. Miller, S.E. Selgrade, S.I. Miller, M. Denton, S.P. Conway, H.K. Johansen, d N. Hoiby. 2012. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 56:1019-1030.
11. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global Spread of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis*. 2011; 17:1791-8. [Internet] [Diunduh pada 2 September 2016) Terdapat dalam <http://www.cdc.gov/eid>
12. World Bank Group (WBG). 2016. Discussion draft: drug resistant infections a threat to our economic future. International Bank for Reconstruction and Development/ The World Bank. 1818 H Street NW, Washington, DC 20433