DETEKSI GEN RESISTAN SIPROFLOKSASIN *qnrA, qnrB,* DAN *qnrS* PADA *ESCHERICHIA COLI* MULTIRESISTAN KOLISTIN DAN SIPROFLOKSASIN

Maria Fatima Palupi, Ernes Andesfha, MeutiaHayati, Dina Kartini, Eli Nugraha, Neneng Atikah

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
Jl. Raya Pembangunan Gunungsindur – Bogor 16340
Email penulis korespondensi: lupi_ima@yahoo.co.id

ABSTRAK

Resistansi terhadap siprofloksasin dan kolistin yang merupakan *Highest Priority Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* merupakan ancaman yang serius bagi dunia kesehatan. Penyebaran gen resistan melalui plasmid meningkatkan risiko meluasnya resistansi suatu antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen resistansi siprofloksasin yang berada di plasmid yaitu *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* pada 20 isolat *Escherichia coli* resistan kolistin-siprofloksasin. Kedua puluh isolat tersebut telah dideteksi ada tidaknya gen *mcr-1* dan didapatkan 15 isolat memiliki gen *mcr-1.* Dua puluh arsip isolat *E. coli* resistan kolistin-siprofloksasin arsip Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan hasil isolasi tahun 2019 diuji deteksi gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Berdasarkan uji PCR terhadap 20 isolat tersebut didapatkan 7 isolat (35%) memiliki gen *qnrA*, 4 isolat (20%) memiliki gen *qnrB,* 3 isolat (15%) memiliki gen *qnrS,* 2 isolat (10%) memiliki gen *qnrA* serta *qnrS*, dan 4 isolat (20%) negatif terhadap ketiga gen tersebut. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya ancaman resistansi yang serius mengingat isolat yang digunakan resistan terhadap kolistin dan siprofloksasin serta gen yang ditemukan berada di plasmid sehingga dapat disebarkan melalui konjugasi bakteri.

Kata kunci: siprofloksasin, *qnrA, qnrB, qnrS, Escherichia coli,* resistan, kolistin

PENDAHULUAN

Resistansi antimikroba merupakan ancaman bagi kesehatan dan kehidupan manusia maupun hewan. Infeksi agen patogen resistan antimikroba pada manusia merupakan ancaman yang serius. Sebagai contoh, di India sebanyak 58.319 bayi meninggal per tahun berkenaan dengan resistansi antimikroba dan diperkirakan 25.000 orang pertahun di Eropa meninggal akibat infeksi bakteri resistan antimikroba (Laxminarayan *et al.* 2013).

Penggunaan antimikroba yang sama di manusia dan hewan produksi diduga sebagai salah satu penyebab timbul dan menyebarnya bakteri resistan antimikroba pada manusia. Beberapa antimikroba yang digunakan di hewan produksi merupakan antimikroba yang masuk dalam *Highest Priority Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*. Badan Kesehatan Dunia memasukkan 6 jenis antimikroba dalam kategori *Highest Priority Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* yaitu sefalosporin (generasi ke-3, 4, dan 5), glikopeptid, makrolid, polimiksin, kuinolon, dan ketolide (WHO 2017). Bakteri resistan antimikroba yang berasal dari hewan hidup atau produk hewan sangat mungkin memapar manusia. Terpaparnya manusia dengan bakteri resistan bisa terjadi saat manusia bersinggungan langsung dengan hewan hidup, lingkungan kandang, maupun produk mentah hewan produksi (Palupi 2019).

Pada akhir tahun 2015, penggunaan kolistin yang merupakan *last drug of choice* untuk melawan infeksi bakteri gram negatif multiresistan-karbapanemase di hewan produksi menjadi sorotan dunia. Hal ini disebabkan ditemukannya gen *mobilized colistin resistance* (*mcr*)-*1* yang dapat dipindahkan melalui plasmid oleh Liu *et al.* (2015). Mengingat pentingnya posisi kolistin di manusia, maka beberapa negara setelah melakukan surveilans resistansi kolistin dan gen *mcr-1*, dengan segera melarang penggunaan kolistin pada hewan produksi. Selain kolistin, obat yang juga menjadi sorotan penggunaannya di hewan produksi oleh Badan Kesehatan Hewan Dunia adalah golongan kuinolon dan sefalosporin.

Siprofloksasin merupakan antimikroba golongan kuinolon kelompok fluorokuinolon yang juga diperbolehkan untuk digunakan di hewan produksi di Indonesia (DJPKH 2016). Berdasarkan Indeks Obat Hewan Indonesia Tahun 2016, terdapat 22 produk nama dagang obat hewan yang mengandung siprofloksasin. Siprofloksasin merupakan golongan fluorokuinolon kedua terbanyak yang diregistrasikan untuk digunakan di hewan setelah enrofloksasin. Pada manusia, siprofloksasin memegang peranan penting karena digunakan sebagai pengobatan antraks. Hal ini disebabkan resistansi terhadap doksisiklin sebagai pilihan utama pengobatan infeksi antraks semakin meningkat sehingga siprofloksasin digunakan sebagai terapi untuk infeksi antraks. Selain itu, siprofloksasin sangat penting bagi pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *E. coli* dan *Salmonella* yang berkenaan dengan *food borne disease.* Siprofloksasin juga efektif membantu pengobatan pada penyakit malaria, kanker, dan AIDS (Castro *et al.* 2013)

E. coli merupakan bakteri gram negatif golongan *Enterobacteriaceae* dan merupakan salah satu dari sekian banyak jenis bakteri komensal yang berada di dalam usus bagian bawah hewan berdarah panas. Sebagian besar strain *E. coli* merupakan strain non patogen, akan tetapi beberapa strain merupakan patogen dan zoonosis yang dapat menyebabkan sakit yang cukup parah bagi manusia maupun hewan. Bakteri ini bagi kesehatan hewan memegang peranan penting dalam monitoring resistansi karena merupakan bakteri komensal dan terdapat strain zoonosis yang fatal bagi manusia (OIE 2016). Resistansi *E. coli* terhadap antimikroba merupakan salah satu dari tiga infeksi resistansi yang paling utama merugikan bagi manusia selain tuberkulosis dan malaria. Adapun dari tiga infeksi tersebut hanya resistansi *E. coli* yang dapat dikaitkan dengan praktik pertanian–peternakan (Grace 2015).

Mengingat pentingnya posisi siprofloksasin dan kolistin pada manusia, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gen resistan siprofloksasin pada *E. coli* yang juga resistan kolistin. Identifikasi gen resistan siprofloksasin diutamakan pada gen resistan yang bisa menyebar melalui plasmid yaitu *qnrA, qnrB,* dan *qnrS.* Informasi ini sangat penting untuk mengetahui risiko penyebaran bakteri resistan antimikroba yang sangat penting bagi manusia.

MATERI DAN METODA

Dua puluh arsip isolat *E. coli* resistan sipkolistin-rofloksasin arsip Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan hasil isolasi dari ayam broiler tahun 2019 diuji deteksi gen resistan *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Uji kepekaan terhadap kolistin dan siprofloksasin sebelumnya dilakukan dengan menggunakan *agar dilution* dengan menggunakan Muller Hinton Agar (Difco/DB-FRA), standar siprofloksasin (Sigma, USA), dan kolistin (Sigma, USA). *E. coli* dinyatakan resistan terhadap siprofloksasin dan kolistin jika memiliki nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) ≥ 4 µg/mL (CLSI 2016). Deteksi gen *mcr-1* sudah dilakukan sebelumnya dengan menggunakan PCR (Liu *et al.* 2015; Cavaco *et al.* 2016).

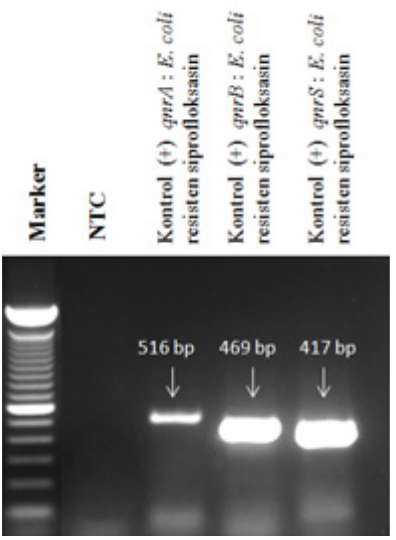
Deteksi gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* dilakukan menggunakan metode PCR *multiplex* dan kit KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (Wilmington, USA). Volume total reagen amplifikasi adalah 10 µL yang terdiri dari 5 µL *mastermix*, 0.2 µL setiap primer *forward* dan *reverse* (10 µM) gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS*, 2.8 µL H_2O, dan 1 µL *template* DNA. Proses amplifikasi diawali pre denaturasi 95°C selama 3 menit, dilanjutkan 35 siklus terdiri dari denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, dan ekstensi 72°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit.

Reagen amplifikasi deteksi *quinolone region determining resistance* (QRDR) target gen *qnr* menggunakan PCR Kit (*HotStarTaq® Master Mix Kit* Qiagen, Germany). Volume total reagen PCR 25 µL yang terdiri dari 12.5 µL *HotStarTaq master mix*, 1 µL primer *forward qnr* (10 µM), 1 µL primer *reverse qnr* (10 µM), 5.5 µL dH_2O, dan 5 µL DNA *template*. Proses PCR diawali pre denaturasi 95°C selama 15 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit, ekstensi suhu 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir suhu 72°C selama 10 menit. Produk PCR divisualisasi menggunakan gel agarose 1.5%, pewarna *SYBR safe* (Thermo Fisher Scientific, USA), marker 100 bp (Thermo Fisher Scientific, USA) dan dokumentasi menggunakan *Gel Documentation Systems* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Primer *forward* dan *reverse* untuk gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* yang digunakan tersaji dalamTabel 1. Selama pengujian deteksi gen selalu disertakan kontrol positif *E. coli* resistan siprofoksasin yang memiliki gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* sebagaimana dalam Gambar 1.

Tabel 1 Gen target dan sekuen primer gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* (Stephenson *et al.* 2010)

Gen target	Sekuen basa primer	Amplikon (suhu *annealing)*
qnrA	(F) 5′- ATTTCTCACGCCAGGATTTG -3′ (R) 5′- ATTTCTCACGCCAGGATTTG -3′	516 bp (55 °C)
qnrB	(F) 5′- GATCGTGAAAGCCAGAAAGG -3′ (R) 5′- ACGATGCCTGGTAGTTGTCC -3′	469 bp (55 °C)
qnrS	(F) 5′- ACGACATTCGTCAACTGCAA -3′ (R) 5′- TAAATTGGCACCCTGTAGGC -3′	417 bp (55 °C)



Gambar 1 Amplifikasi PCR gen *qnrA* (516 bp), *qnrB* (469 bp), dan *qnrS* (417 bp) penyandi resistensi kuinolon pada kontrol positif isolat *E. coli* resistan siprofloksasin. Marker 100 bp, NTC: *non template control*.

HASIL

Berdasarkan uji identifikasi gen resistan *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* dari 20 isolat *E. coli* resistan kolistin-siprofloksasin terdapat 4 isolat (20%) yang tidak memiliki ketiga gen tersebut. Adapun 16 isolat yang lain memiliki salah satu gen atau dua gen sekaligus dengan data sebagai berikut: 7 isolat (35%) memiliki gen *qnrA*, 4 isolat (20%) memiliki gen *qnrB,* 3 isolat (15%) memiliki gen *qnrS,* 2 isolat (10%) memiliki gen *qnrA* serta *qnrS*. Selain itu, dari 15 isolat resistan kolistin-siprofloksasin yang memiliki gen *mcr-1* hanya 1 isolat saja yang tidak memiliki satupun gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS.* Hasil sebagaimana tersaji dalam Tabel 2.

Tabel 2 Hasil Uji Indentifikasi Gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* terhadap *E. coli* resistan siprofloksasin-kolistin

No	Kode Isolat	Gen resistan			Nilai KHM siprofloksasin	Nilai KHM kolistin*
		qnrA	*qnrB*	*qnrS*		
1	MU12c (49/2)	+	-	-	8	8^{+}
2	MU37a (88/12)	-	-	-	8	4^{+}
3	MU037c (90/13)	+	-	-	8	4^{+}
4	MU038d (93/14)	+	-	-	4	4^{+}
5	MU039b (95/16)	-	-	+	8	4^{+}
6	MU040a (97/97)	-	+	-	4	8^{+}
7	MU041c (100/20)	-	-	-	16	4^{+}
8	MU041d (101/21)	-	-	+	8	4^{+}
9	MU042b (104/23)	-	+	-	4	4^{+}
10	MU042c (105/24)	+	-	+	8	8^{+}
11	MU045c (111/25)	-	-	+	4	4^{-}
12	MU046a (114/26)	+	-	+	8	4^{+}
13	MU046b (116/27)	+	-	-	8	8^{+}
14	MU046c (117/28)	+	-	-	8	8^{+}
15	MU047a (118/29)	-	+	-	16	8^{+}
16	MU047b (119/30)	+	-	-	32	8^{-}
17	MU035b (150/9)	-	-	-	4	4^{-}
18	MU036a (152/10)	-	-	-	16	4^{-}
19	MU036b (153/11)	+	-	-	8	4^{-}
20	P46 (161/46)	-	+	-	8	8^{+}

Keterangan: *hasil uji pengkajian resistansi kolistin BBPMSOH tahun 2019; $^{+}$positif gen *mcr-1*; $^{-}$negatif gen *mcr-1*

PEMBAHASAN

Siprofloksasin merupakan antibakteri dengan aksi bakterisidal yang ditunjukkan dengan cara menghambat atau menghalangi enzim topoisomerase IV dan topoisomerase II (DNA *gyrase*). Enzim-enzim ini memegang peranan penting dalam pembentukan DNA bakteri, transkripsi, rekombinasi, dan replikasi DNA bagi bakteri (Khan *et al.* 2015).

Siprofloksasin merupakan antimikroba berspektrum luas yang bisa digunakan untuk terapi infeksi *Streptococcus pneumoniae* (isolat yang hanya peka terhadap penicillin), *Enterococcus faecalis* (isolat yang hanya peka terhadap vankomisin), *Staphylococcus epidermidis* (isolat yang hanya peka terhadap methicillin), *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* (isolat yang hanya peka terhadap methicillin), *Streptococcus pyogenes*, bakteri gram negatif, *Citrobacterkoseri* (diversus), *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Morgan ellamorganii*, *Haemophilus influenza*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumonia*, *Moraxella catarrhalis*, *Campylobacter jejuni*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*,

Serratia marcescens, *Shigella boydii, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri,* dan *Shigella sonnei* (Paterson *et al.* 2000).

Peningkatan konsumsi siprofloksasin memacu timbulnya resistansi patogen nosocomial karena flurokuinolon memiliki seleksi resistansi lebih luas dibanding aminoglikosid, karbapenem, atau ß-laktam. Strain-strain yang resistan fluorokuinolon juga dapat lebih mudah menyebar dibandingkan dengan strain resistan antimikroba yang lain (Castro *et al*. 2013).

Resistansi kuinolon yang dimediasi plasmid atau *plasmid-mediated quinolone resistance* (PMQRs) dimediasi oleh *quinolone-resistance protein* (QNR) atau disebut QnrA1. QnrA1 merupakan keluarga protein pentapeptid yang melindungi enzim target yaitu enzim topoisomerase IV dan topoisomerase II (DNA *gyrase*) dari aksi kuionolon. Menurut Abornoz *et al.* (2017) terdapat tujuh protein *Qnr* yang telah teridentifikasi yaitu *QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD, QnrVC,* dan *QnrE*, dengan berbagai variasi genetik. Mekanisme kedua dari PMQR adalah dengan melibatkan *mutant aminoglycoside-modifying enzyme* (*AAC(6')-Ib-cr*) yang mampu memodifikasi beberapa kuinolon, termasuk siprofloksasin dan norfloksasin, dengan menambahkan grup asetil sehingga akan mengurangi kemampuan aktifitas antibakteri dari kuinolon (Robicsek *et al.* 2006). Mekanisme ketiga PMRQ adalah mengaktifkan pompa *efflux* QepA dan oqxAB. QepA merupakan transporter *proton-dependent* yang masuk dalam super family fasilator utama yang menyebabkan *hydrophilic quinolone resistance* (Yamane *et al.* 2007), sementara itu OqxAB merupakan pompa *efflux multidrug transmissible resistance-nodulation-division* (RND) yang baru diketahui mampu menurunkan kepekaan bakteri terhadap siprofloksasin dan asam nalidiksik (Kim *et al.* 2009).

Pada penelitian ini menunjukkan 45% isolat resistan kolistin-siprofloksasin memiliki gen *qnrA* (2 diantaranya juga memiliki gen *qnrS*). Hasil ini menunjukkan praduga prevalensi gen *qnrA* lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian di Bangladesh oleh Mahmud *et al.* (2018). Mahmud *et al.* (2018) juga mengambil isolat *E. coli* dari broiler, dan dari 18 isolat resistan fluorokuinolon tidak ada yang memiliki gen *qnrA*. Hasil uji deteksi gen pada isolat yang hanya memiliki gen *qnrA* dalam penelitian ini (35%), apabila dibandingkan dengan penelitian Kurnia *et al.* (2018) menunjukkan angka persentase yang lebih rendah. Dalam penelitian deteksi gen *qnrA* yang dilakukan oleh Kurnia *et al.* (2018) pada 25 isolat *E. coli* patogen dari Sukabumi - Indonesia, 52% diantaranya resistan siprofloksasin, menunjukkan 61.6% memiliki gen *qnrA.*

Jumlah isolat yang memiliki gen *qnrS* ada 5 isolat (25%) dan 2 diantaranya memiliki gen *qnrA* (Tabel 2). Jumlah ini lebih rendah dari penelitian Mahmud *et al.* (2018) dalam penelitiannya sebanyak 72.22% isolat resistan fluorokuinolon memiliki gen *qnrS*. Adapun hasil dari Kurnia *et al.* (2019) menunjukkan angka yang sama yaitu 25% dari isolat yang diuji memiliki gen *qnrS.* Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa gen *qnrB* paling sedikit ditemukan dibandingkan dengan

gen *qnrA* dan *qnrS* yaitu 15%. Hasil ini juga sesuai dengan hasil penelitian Kurnia *et al.* (2018) yang juga menemukan bahwa *qnrB* yang paling sedikit ditemukan diantara ketiga gen yang diidentifikasi.

Beberapa perbedaan hasil persentase gen *qnrA, qnrB,* dan *qnrS* dapat disebabkan karena perbedaan isolat *E. coli* yang diambil antara lain wilayah pengambilan dan tipe isolatnya. Pada penelitian ini yang diuji identifikasi gen *qnrA*, *qnrB*, dan *qnrS* adalah *E. coli* yang resistan siprofloksasin dan kolistin, adapun pada penelitian Kurnia *et al.* (2015) pengujian dilakukan pada 25 isolat *E. coli* patogen baik yang resistan siprofloksasin atau tidak. Adapun pada penelitian yang dilakukan oleh Mahmud *et al.* (2019), uji identifikasi gen *qnrA* dan *qnrS* dilakukan pada 18 isolat yang resistan fluorokuinolon tetapi tidak diuji resistannya terhadap siprofloksasin. Perbedaan tipe isolat inilah yang dapat menyebabkan perbedaan persentase dari tiap gen yang diuji. Meskipun demikian, hasil penelitian ini menunjukkan keterkaitan fenotip resistan siprofloksasin dan genotip gen *qnr* yang cukup tinggi. Hal ini dapat dilihat dalam Tabel 2,75% dari isolat yang resistan siprofloksasin memiliki satu atau lebih gen golongan *qnr*.

Pada pengkajian ini ditemukan empat *E. coli* resistan kolistin dan siprofloksasin tetapi tidak memiliki gen penyandi resistansi fluorokuinolon berperantara plasmid yaitu *qnrA*, *qnrB,* dan *qnrS*. Hal ini dapat disebabkan karena mekanisme resistansi fluorokuinolon utamanya disebabkan karena perubahan mutasi pada kromosom di enzim target melalui *stepwise mutations* di *quinolone resistance-determining regions* (QRDRs) dari berbagai gen DNA *gyrase* (*gyrA* dan *gyrB*) dan/atau gen topoisomerase IV (*parC* dan *parE*). Mekanisme mutasi lainnya dapat terjadi pada gen yang mengatur ekspresi dari protein membran luar atau *outer membrane proteins* (*OMPs*) dan pompa *efflux* (Hooper dan Jacoby 2016).

Hasil penelitian ini memberikan informasi yang sangat penting berkenaan dengan resistansi terhadap antimikroba yang masuk dalam *Highest Priority Critically Important Antimicrobials for Human Medicine.* Mengingat isolat yang diuji adalah isolat yang juga resistan terhadap kolistin sulfat. Lima belas dari 20 isolat (75%) diketahui memiliki gen *mcr-1*. Adapun dari 15 isolat yang positif memiliki gen *mcr-1*, hanya satu isolat saja yang negatif terhadap ketiga gen resistan siprofloksasin yang diuji. Hal ini menjadi peringatan yang sangat penting mengingat bahwa gen *mcr-1*, *qnrA*, *qnrB*, dan *qnrS* ditemukan dalam plasmid. Sehingga, gen dengan lebih mudah disebarkan ke bakteri strain lain. Berdasarkan hasil penelitian Poirel *et al.* (2005), resistansi bakteri gram negatif berkenaan dengan gen *qnrA* tidak hanya berasal dari hewan saja. Akan tetapi, lingkungan juga merupakan reservoir bagi bakteri resistan patogen sehingga memajan manusia. Oleh sebab itu, mengingat posisi siprofloksasin yang sangat penting bagi manusia dan tingginya keterkaitan gen dalam plasmid dengan resistansi siprofloksasin multiresistan kolistin, maka sebaiknya siprofloksasin di hewan produksi tidak dijadikan pilihan pertama dalam pengobatan infeksi bakteri.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan adanya keterkaitan fenotip siprofloksasin dan genotipe gen *qnr* yang cukup tinggi yaitu 80% (16/20) dengan rincian 7 isolat (35%) memiliki gen *qnrA*, 4 isolat (20%) memiliki gen *qnrB,* 3 isolat (15%) memiliki gen *qnrS,* 2 isolat (10%) memiliki gen *qnrA* serta *qnrS*, dan 4 isolat (20%) negatif terhadap ketiga gen tersebut. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya ancaman resistansi yang serius mengingat isolat yang digunakan resistan terhadap kolistin dan siprofloksasin serta gen yang ditemukan berada di plasmid. Oleh sebab itu, sangat disarankan untuk menghindari penggunaan siprofloksasin sebagai pilihan pertama dalam pengobatan infeksi di hewan produksi.

DAFTAR PUSTAKA

Albornoz E, Tijet N, De Belder D, Gomez S, Martino F, Corso A, Melano RG, Petroni A. 2017. qnrE1, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of Enterobacter species. *Antimicrob Agents Chemother* (61)5:e02555-16. https://doi.org/ 10.1128/AAC.02555-16

Castro W, Navarro M, Biot C. 2013. Medicinal potential of ciprofloxacin and its derivatives. *Future Med. Chem.* (2013) 5(1): 1–xxx

[CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute. 2016. M100S: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 26th Ed. CLSI. USA. pp: 52-54, 196

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 Updated October 2016. DTU Food – National Institute, Denmark. [Internet]. [Diunduh 24 Juli 2017]. Terdapat dalam http://www.eurl-ar.eu.

[DJPKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2016. Indeks Obat Hewan Indonesia Ed. IX. Jakarta (ID): Kementerian Pertanian Republik Indonesia. pp. 58–599.

Grace D. 2015. Review of evidence on antimicrobial resistance and animal agriculture in developing countries. International Livestock Research Institute (ILRI). http://dx.doi.org/10.12774/eod_crjune2015.graced. pp: 8-18

Hamed SM, Elkhatib WF, El-Mahallawy HA, Helmy MM, Ashour MS, Aboshanab KMA. 2018. Multiple mechanisms contributing to ciprofloxacin resistance among Gram negative bacteria causing infections to cancer patients. *Scientific reports* 8:12268. DOI:10.1038/s41598-018-30756-4

Hooper DC, Jacoby GA. 2016. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320.

Khan GJ, Khan RA, Majeed I, Siddiqui FA, Khan S. 2015. Ciprofloxacin; the frequent use in poultry and its consequences on human health. *Professional Med J* 22(1):001-005.

Kim HB, Wang M, Park CY, Kim EC, Jacoby GA, Hoope DC. 2009. oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemotherapy* (53)8:582–3584. https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08.

Kurnia RS, Indrawati A, Mayasari NLPI, Priadi, A. 2018. Molecular detection of genes encoding resistance to tetracycline and determination of plasmid mediated resistance to quinolones in avian pathogenic *Escherichia coli* in Sukabumi, Indonesia. *Vet World*, EISSN: 2231-0916. doi: 10.14202/vetworld.2018.1581-1586

Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. 2013. Antibiotic resistance – The need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 13:1057-1098.

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. http://dx.doi.org/10/1016/S1473-3099(15)00424-7

Mahmud S, Nazir KHMNH, Rahman MT. 2018. Prevalence and molecular detection of fluoroquinolone-resistant genes (*qnrA* and *qnrS*) in *Escherichia coli* isolated from healthy broiler chickens. *Vet World* 11(12): 1720-1724.

Martinez-Martinez L, Garcia I, Ballesta S, Benedi VJ, Hernandez-Alles S, Pascual A. 1998. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:1850-1852.

[OIE] World Organization for Animal Health. 2016. Terrestrial Animal Health Code Ed. 25th. OIE. Paris, France. Chapter 6.7-6.8

Palup iMF. 2019. Disertasi: Penilaian risiko dan *mutant prevention concentration* kolistin sulfat terhadap resistansi *Escherichia coli* pada broiler. IPB Universtity

Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. 2000. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 30(3): 473-478.

Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. 2005. Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* (49)8: 3523–3525

Stephenson S, Brown PD, Holness A, Wilks M. 2010. The emergence of *qnr*-mediated quinolone resistance among *Enterobacteriaceae* in Jamaica. *West Indian Med J* 59(3):241-244

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CY, Bush K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature medicine* (12): 83–88.https://doi.org/10.1038/nm1347

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*(51): 3354–3360. https://doi.org/10.1128/AAC.00339-07

[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