Isolasi *Escherichia coli* dan Deteksi Gen *mobilized colistin resistance (mcr)-1* pada *Escherichia coli* Resistan Kolistin dari Sampel Usap Kloaka Broiler di Tujuh Provinsi di Indonesia

Ernes Andesfha[1], Meutia Hayati[1], Dina Kartini[1],Maria Fatima Palupi[2], Neneng Atikah[1], Istiyaningsih[1], Joen Firmanta[1], Novy Rianti[1], Sarji[1], Deden Amijaya[1], Nurhidayah[2], Siti Komariah[2], Sri Arofah[3]

[1]Unit Uji Bakteriologi - Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
[2] Unit Farmasetik dan Premiks - Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
[3] Unit Supply Center - Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

Email: ernesandesfha@ymail.com

ABSTRAK

Penggunaan antibiotik yang intensif dalam upaya pencegahan dan pengobatan infeksi bakteri dalam bidang peternakan berdampak pada munculnya bakteri resistan yang memberikan ancaman besar dalam kehidupan manusia dan hewan. Kolistin merupakan *last drug choice* bagi pengobatan infeksi multiresistan bakteri gram negatif pada manusia. Gen *mcr-1* merupakan gen resistan kolistin yang mampu dipindahkan secara horizontal. Tujuan kajian ini adalah untuk mendapatkan data *E. coli* patogen dan non patogen, prevalensi *E. coli* resistan kolistin, dan deteksi gen *mcr-1* pada *E. coli* resistan kolistin. Sampel yang diuji adalah 48 *pool* sampelusapkloaka ayam broiler yangdiambil dari peternakan broiler di Provinsi Sumatera Utara, Lampung, Banten, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Sulawesi Selatan. Isolasi *E. coli* menggunakan metode SNI 2897:2008, uji patogenesitas menggunakan uji *congo red*, uji kepekaan kolistin menggunakan metode *agar dilution*,dan deteksi gen resistan *mcr-1* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil isolasi dari sampel *pool*usapkloaka diperoleh 159 isolat *E. coli,*sebanyak 69 isolat *E. coli* (43,40%) merupakan isolat patogen dan 90 isolat *E. coli* (56,60%) merupakan isolat non patogen. Prevalensi *E. coli* resistan kolistin adalah 21,38% (CI 95%; CL 15,73-28,39%) dan prevalensi *E. coli* resistan kolistin positif*mcr-1* adalah 15,72% (CI 95%; CL 10,88-22,18%). Keterkaitan genotipik*mcr-1* dan fenotipik *E. coli* resistan kolistin cukup tinggi, hal ini ditunjukkan 73,53% *E. coli* resistan kolistin memiliki gen *mcr-1*. Dua puluh isolat(28,90%) dari isolat *E. coli*patogen ternyata resistan terhadap kolistin. Empat belas isolat (15,60%) dari 90 isolat *E. coli*non patogen menunjukkan resistan terhadap kolistin. Keberadaan *E. coli* patogen resistan kolistin dan memiliki gen *mcr-1* dapat menyebabkan infeksiakansemakin sulit diobati. *E. coli* non patogen resistan kolistin memiliki gen *mcr-1*dapat memberikan bahaya yang besar. Hal ini disebabkan, meskipun bakteri ini tidak menyebabkan infeksi tetapi mampu menyebarkan sifat resistansinya secara horizontal terhadap bakteri lain dan dapat menyebar ke manusia. Hasil kajian ini menunjukkan ancaman resistansi yang cukup serius mengingat prevalensi *E. coli* resistan kolistin dalam kajian ini masuk dalam kategori tinggi. Oleh sebab itu, pelarangan penggunaan kolistin pada hewan produksi merupakan langkah yang tepat untuk mengurangi risiko peningkatan resistansi kolistin.

Kata kunci: *E. coli*, patogen, resistan, kolistin, gen *mcr-1*

ABSTRACT

The intensive use of antibiotics in the prevention and treatment of bacterial infections in livestock has resulted in the emergence of resistant bacteria which pose a major threat to human and animal life. Colistin is the last drug of choice for the treatment of multiresistant infection with gram-negative bacteria in humans. The mcr-1 gene is a colistin resistance gene

that can be transferred horizontally. This study aimed to obtain data on pathogenic and non-pathogenic E. coli, the prevalence of colistin-resistant E. coli, and to detect mcr-1 gene from colistin-resistant E. coli. The samples tested were 48 pools sample of cloacal swab broilers were taken from broiler farms from the provinces of North Sumatra, Lampung, Banten, West Java, Central Java, East Java, and South Sulawesi. Isolation of E. coli using the SNI 2897: 2008 method, the pathogenicity test using the congo red test, the colistin sensitivity test using the agar dilution method, and the detection of the mcr-1 resistance gene using the polymerase chain reaction (PCR) method. The isolation results from the cloacal usap pool samples obtained 159 E. coli isolates, a total of 69 E. coli isolates (43,40%) were pathogenic isolates and 90 E. coli isolates (56,60%) were non-pathogenic isolates. The prevalence of colistin-resistant E. coli was 21,38% (95% CI; CL 15,73-28,39%) and the prevalence of mcr-1 positive colistin-resistant E. coli was 15,72% (95% CI; CL 10,88-22,18%). The agreement between genotypically mcr-1 gene and phenotypically colistin-resistant E. coli is quite high, this is indicated by 73,53% of colistin-resistant E. coli has the mcr-1 gene. Twenty isolates (28,90%) of the pathogenic E. coli isolates were found resistant to colistin. Fourteen isolates (15,60%) of non-pathogenic E. coli isolates showed resistance to colistin. The presence of the colistin-resistant pathogenic E. coli that has the mcr-1 gene can make the infection more difficult to treat. Colistin-resistant non-pathogenic E. coli has the mcr-1 gene which can pose a great danger because although this bacterium does not cause infection, it can spread its resistance gene horizontally to other bacteria and can spread to humans. The results of this study indicate a serious threat of resistance given that the prevalence of colistin-resistant E. coli in this study falls into the high category. Therefore, prohibiting the use of colistin in production animals is the right step to reduce the risk of increased colistin resistance.
Keywords: E. coli, pathogen, resistant, colistin, mcr-1

PENDAHULUAN

Perhatian dan fokus dunia dalam 10 tahun terakhir ini banyak tertuju kepada isu *Antimicrobial Resistance* (AMR) sebagai salah satu dampak penggunaan antibiotik yang tidak bijaksana. AMR menjadi isu global karena permasalahannya sangat kompleks dan upaya pengendaliannya membutuhkan peran dari semua pihak di bidang kesehatan hewan dan manusia sebagai satu kesatuan kesehatan dunia. Penelitian, kajian, dan informasi tentang dampak dari AMR telah banyak dilakukan. Akibat dari AMR antara lain, angka morbiditas menjadi meningkat, angka mortalitas meningkat, periode infeksi lebih lama, produktifitas ternak menurun, dan biaya pengobatan atau perawatan meningkat.

E. coli adalah bakterikomensal yang sebagian besar adalah bakteriaerobik yang secara normal terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas. Keberadaan *E. coli* dianggap sebagai indikator utama kontaminasi feses pada makanan dan air [(19)]. Banyak strain *E. coli* dapat muncul sebagai patogen karena keberadaan faktor patogenik tertentu dan gen virulen yang terletak pada *element genetic* dan sebagai pembeda dari strain *E. coli* komensal [(38)]. *Colibacillosis* adalah infeksi *E. coli* patogen yang sangat umum yang

menyebabkan kerugian ekonomi pada peternakan unggas karena menurunkan produktivitas, meningkatkan mortalitas, pengafkiran karkas terinfeksi, meningkatkan biaya pencegahan, dan pengobatan unggas yang terinfeksi [26]. *E.coli* juga banyak digunakan untuk pemantauan dan surveilans resistansi antimikroba [45]. Peternakan unggas yang terinfeksi *E. coli* akan menjadi sumber penularan antar ayam dalam peternakan tersebut serta lingkungannya, sehingga tidak menutup kemungkinan lingkungan yang terkontaminasi bisa menjadi sumber terjadinya *foodborne zoonoses diseases.* Apabila *E. coli* memiliki gen penyandi resistan maka bakteri tersebut dapat menyebarkan gen resistan antar ayam di lingkungan di peternakan dan juga menyebar ke manusia yang mengkonsumsi produk unggas.

Berdasarkan Keputusan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan (DJPKH) Nomor 09111/Kpts/PK 300/F/09/2018 tentang Petunjuk Teknis Penggunaan Obat Hewan Dalam Pakanuntuk Tujuan Terapi, menyatakan bahwa antibiotik dapat dicampur dalam pakan untuk keperluan terapi. Penggunaan antibiotik dalam pakan yang tidak sesuai dosis terapi akan menimbulkan dampak buruk pada ternak, yaitu apabila dosis terlalu tinggi dapat menimbulkan efek toksik, sedangkan jika dosis terlalu rendah akan tidak memiliki efek terapi yang diharapkan.

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 53/Permentan/OT.140/5/2013 tentang Organisasi dan Tata Kerja BBPMSOH mempunyai tugas pokok dan fungsi antara lain melaksanakan *monitoring* efek samping obat hewan. AMR merupakan salah satu efek samping penggunaan antimikroba yang tidak bijaksana. Dalam hal ini, resistansi dapat mempengaruhi efikasi antimikroba saat digunakan dalam pengobatan hewan, sehingga AMR masuk dalam *pharmacovigillance*. Guna melaksanakan tupoksi tersebutUnit Uji Bakteriologi, Farmasetik dan Premiks, dan Bioteknologi BBPMSOH melakukan kegiatan pengkajian *E. coli*dalam rangka pemetaan AMR dengan cara mengambil sampel usap kloaka dari peternakan ayam broiler. Tujuan kegiatan pengkajian ini untuk (1) mendapatkan isolat *E. coli* dari sampel usap kloaka ayam broiler, (2) mendapatkan data isolat *E. coli* patogen dan non patogen, (3) memperoleh data prevalensi isolat *E. coli*resistan kolistin, (4) keberadaan gen *mcr-1* dari isolat *E. coli* resistan kolistin, dan (5) melihat keterkaitan genotip *mcr-1* dengan fenotip resistan kolistin pada *E. coli* yang didapatkan dari tujuh provinsi di Indonesia.

Kolistin merupakan antibiotikyang masuk dalam *highest critically important antimicrobials for human* dan kolistin banyak digunakan di hewan produksi. Adapun pemilihan gen *mcr-1*, disebabkan karena gen ini merupakan gen resistan kolistin yang pertama kali ditemukan mampu dipindahkan melalui plasmid [25]. Hasil kajian ini diharapkan diperoleh *output*

data tentang gambaran pola resistansi *E. coli* terhadap kolistin sulfat di peternakan ayam pedaging atau broiler. Data tersebut dapat menjadi bahan dasar kebijakan DJPKH dalam upaya mengurangi penyebaran AMR, mengatur pemakaian antibiotik untuk pakan terapi dan pemilihan antibiotik untuk terapi di bidang kesehatan hewan di Indonesia.

METODE

Waktu, Tempat,dan Lingkup Pengkajian

Kegiatan pengkajian ini terbagi dalam dua tahap yaitu tahap pengambilan sampel di tujuh provinsi dilaksanakan bulan Agustus-September 2019 dan tahap pengujian sampel di BBPMSOH dilaksanakan bulan September-November 2019. Tahap pengujian meliputi isolasi *E. coli*, uji patogenitas *E. coli* di Unit Uji Bakteriologi, uji kepekaankolistin di Unit Uji Farmasetik, dan deteksi gen*mcr-1*di Unit Bioteknologi**.**

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada isolasi dan uji patogenesitas *E. coli* adalah*Phosphate Buffer Saline* (PBS),*Buffer Phosphate Water* (BPW), media *Lauryl Tryptose Broth* (LSTB) (Difco, USA), *Escherichia Medium* (ECM) (Difco, USA), *Eosin Methylene Blue* (EMB) (Oxoid, UK), *Heart Infusion Agar* (HIA) (Difco, USA), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Simmons Citrat Agar* (SCA) *(*Oxoid, UK), *Sulfide Indole Motility agar* (SIM) (Oxoid, UK)*,* Reagen *Alph-anaphtol*, *Potassium Hydroxide* (KOH), *Methyl Red-Voges Proskauer broth* (MR-VP) (Merck, Germany), *Methyl Red* (Kanto Chemical, Japan), *Congo Red* (Sigma, USA). Bahan yang digunakan untuk uji kepekaan *E. coli* terhadap kolistin sulfat adalah agar Mueller-Hinton (MHA) (Difco/DB, USA), standar kolistin sulfat (Sigma-USA), *distillated water* steril, Heart Infusion Broth (HIB) (Difco, USA), dan*E. coli* ATCC25922sebagai kontrol. Adapun untuk uji deteksi gen *mcr-1* diperlukan, primer *mcr-1*, Prepman solution, Kit *HotStarTaq® Master Mix Kit*(Qiagen, Germany),*Agarose Gel, SYBR Safe DNA Gel Stain, DNA Ladders100 bp, Loading dye,* dan *TAE Buffer10X.*

Alat-alat yang digunakan antara lain timbangan digital, tabung reaksi, *erlenmeyer,* gelas ukur, ose, cawan petri, autoklaf, pipet 1 mL, 2 mL, 5 mL, 9 mL dan 10 mL, pH meter, tabung mikrotube 200 µL, mikropipet dan tips volume 10 µL, 100 µL, 1000 µL, *hot plate*, inkubator 35^{0}C dan 42^{0}C, *bench hood,* mikrospin, mikrosentrifuse, *ice plate*, vortex, microwave, cetakan *agarose* dan *comb*, mesin PCR *thermal cycler* (ABI Veriti, Applied Biosystems, USA), peralatan elektroforesis dan peralatan *gel documentation system* (FireReader V10, Cleaver Scientific, UK).

Sampel Pengkajian

Pemilihan lokasi sampling berdasarkan metode *proportional sampling*dengan melihat jumlah populasi broilerberdasar buku Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan tahun 2018. Sampel diambil dari 7 provinsi (Tabel 1), pada setiap provinsi dipilih 1-2 kabupaten/kota, sampel yang diambil berupa usapkloaka. Minimal besaran sampel, dalam hal ini satuan terkecil adalah jumlah kandang broiler, yang disampling dihitung dengan menggunakan rumus:

$$n = (1.96^2 \times (P(1-P)))/ e^2$$

Besaran sampel dinyatakan dalam n, P adalah prevalensi dengan menggunakan hasil penelitian Palupi *et al.* (2019), dengan tingkat kepercayaan 95%, dan e adalah tingkat kesalahan maksimum (10%). Sehingga didapatkan jumlah minimum sampel yang harus diambil adalah 44 kandang. Oleh sebab itu, tiap kali pengambilan di provinsi diambil enam kandang broiler dan karena di Jawa Barat dilakukan dua kali pengambilan, maka di Jawa Barat diambil 12 kandang, sehingga keseluruhan besaran sampel didapatkan 48 kandang.

Pool usap kloaka diambil dari 5 ayam broiler hidup/kandang menggunakan *cotton usap* steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi media pembawa (PBS) steril.Sampel usap dibawa ke laboratorium dengan menggunakan *cooler box.*

Tabel 1 Data lokasidan besaran*pool* sampel pengkajian

Provinsi	**Kabupaten**	***Jumlah pool*usap kloaka**
Sumatera Utara	Kab. Deli Serdang	6
Lampung	Kota Bandar Lampung	6
Banten	Kab. Tangerang	6
Jawa Barat	Kab. Bogor, Kab. Bekasi	12
Jawa Tengah	Kab. Batang, Kota Semarang	6
Jawa Timur	Kab. Mojokerto, Kota Surabaya	6
Sulawesi Selatan	Kab. Maros, Kota Makassar	6
	Total	**48**

Isolasi *Escherichia coli*

Isolasi *E. coli* menggunakan metode uji berdasar SNI 2987:2008, isolasi meliputi tahap pra-pengayaan, pengayaan, agar selektif, dan uji biokimia[40]. Sampel yang menunjukkan reaksi

positif *E. coli* hingga tahap pengujian biokimia dilakukan uji lanjutan yaitu uji patogenitas *E. coli* secara invitro dengan menggunakan uji *congo red* [4].

Pra-pengayaan dilakukansebagai berikut sampel *pool*usap kloaka dalam media PBS diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL media LSTB steril dan dihomogenkan dengan vortex, selanjutnya diinkubasi pada suhu 35ºC selama 24 jam ± 2 jam.Isolasi *E. coli* pada agar selektif dilakukan dengan cara mengambil satu ose sampelyangtelahdiinkubasidalam mediapengayaan kemudianditanam pada agar EMB dan diinkubasi pada suhu 35°C selama24jam±2jam. Koloni tunggal tipikal *E. coli* berwarna keemasan, dan diambil 3-5 koloni tunggal untuk setiap *pool* sampel. Selanjutnya tiap koloni dilakukan purifikasi dengan mengkultur koloni tunggal pada media EMB dan media umum HIA untuk kemudian dilanjutkan ke uji biokimia.

Uji biokimiadengan menanamkoloni *E. coli* ke media TSIagarmiring, media SIM untuk uji indol, media MR-VP untuk uji MR-VP, dan media sitrat agar untuk uji sitrat. Bakteri dinyatakan sebagai *E. coli*jika: (1) setelah inkubasi pada media TSIpadabagianpermukaanmiring(*slant*) berwarnakuningdantidakmemproduksiH_2S, (2) pada uji indol *E. coli* menunjukkan hasil positif dengan terbentuk cincin merah,(3) pada uji VPnegatiftidakterjadiperubahanwarna padamediasetelahditetesidengan pereaksi *Alpha-naphtol*dan KOH, (4) pada uji MR positif, dan (5) pada uji sitrat hasilnyanegatif yaitutidakadaperubahan pada media yang tetap berwarnahijau.

Uji Patogenesitas *Escherichia coli*

Uji patogenitas*E. coli* secara invitro menggunakan media *congo red*[4]. Isolat *E.coli*yangsudahdipurifikasidibiakkanpadamedia agar *congo red*dan diinkubasikanpadasuhu37 °C selama24jam. Inkubasi kemudian dilanjutkanpadasuhu kamarselama48jam. Koloniyangberwarnamerah(mengikat*congo red*)adalahisolat*E.coli* patogensedangkankoloniyangberwarnaputih(tidakmengikat*congo red*)adalahisolat*E.coli*non patogen.

Uji Kepekaan *Escherichia coli* Terhadap Kolistin

Uji kepekaan atau resistansi *E. coli* kolistin dilakukan dengan metode *agar dilution* (AD) untuk menentukan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) [4,12,28].Media yang digunakan adalah MHA yang mengandung standar kolistin sulfatdengan konsentrasi kelipatan dua dari 0,125 µg/mL hingga 16 µg/mL. *E. coli* ATCC25922 digunakan sebagai isolat kontrol sedangkan MHA tanpa kolistin sulfat digunakan sebagai media kontrol [10].Isolat dinyatakan resistan kolistin

jika nilai KHM > 2 µg/mL [14]. Metode AD memberikan kecenderungan memberikan nilai KHM lebih tinggi dari metode *broth microdilution* (BMD), akan tetapi metode AD sangat berguna untuk menentukan resistansi kolistin. Apabila dibandingkan dengan metode BMD, yang merupakan metode rujukan untuk resistansi kolistin, metode AD menunjukkan tingkat *very major errors* (hasil *false-susceptible*) 0,7–3,3 % yang rendah dan tingkat *major errors* (hasil *false-resistant*) 2,4- 4,9% [3,12]. Menurut penelitian Turlec-Rogacka *et al.*(2018) metode AD menunjukkan tingkat reprodusibilitas, robustness, dan tingkat kemudahan yang jauh lebih tinggi jika dibandingkan uji BMD untuk uji resistansi kolistin[42].

Uji Deteksi Gen *mcr-1*

Isolat *E. coli* resistan kolistin ditumbuhkan di media HIA selama 24 jam pada suhu 37 ℃. *E. coli* yang telah tumbuh di media HIA diekstraksi dengan menggunakan metode *boiling* yaitu koloni diambil sebanyak 1–2 ose dan dilarutkan dengan 100 µl PBS steril. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10–30 detik dan dipanaskan pada suhu 100℃ selama 10 menit. Sampel yang telah dipanaskan kemudian didinginkan selama 2 menit di suhu ruang, selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 2 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 50 µL sebagai *master stock* DNA[13].

Deteksi gen *mcr-1* sebagai gen penyandi resistansi terhadap kolistin menggunakan metode PCR *simplex* dengan panjang amplikon 309 bp. Komposisi reagen *master mix* PCRmenggunakan kit PCR *HotStarTaq® Master Mix Kit* Qiagen, volume total 25 µL yang terdiri dari 12,5 µL*HotStarTaq master mix*, 1 µLprimer *forward* (5 µM) 5′-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3′, 1 µLprimer *reverse* (5 µM) 5′-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3′[25], 5,5 µLdH_2O, dan 5 µLDNA *template*. Proses PCR dilakukan dengan siklus pre denaturasi 95 ℃ selama 15 menit, dilanjutkan dengan 25 siklus yang terdiri dari denaturasi 94 ℃ selama 30 detik, *annealing* 57,5 ℃ selama 90 detik, ekstensi pada suhu 72 ℃ selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72 ℃ selama 10 menit. Pembacaan hasil PCR melalui tahap elektroforesis menggunakan *agarose gel* 1,5%, adapun pewarnaan *SYBR safe* dan marker 100bp menggunakan mesin *gel documentation system*. Hasil positif gen *mcr-1* ditunjukkan dengan munculnya pita dengan panjang amplikon 309 bp. Sebagai kontrol positif digunakan isolat*E. coli* yang memiliki gen *mcr-1* dari penelitian Palupi *et al*. (2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dari 48 sampel *pool*usap kloaka ayam broiler diperoleh 159 isolat *E. coli*. Selanjutnya 159 isolat *E. coli*diuji patogenitas secara invitro pada media *congo red*dan diperoleh hasil 69 isolat *E. coli* patogen (43,40%) dan 90 isolat adalah *E. coli* non patogen (56,60%) (Tabel 2). *E. coli* patogen terisolasi paling banyak dari sampel usap kloaka yang berasal dari Provinsi Jawa Barat yaitu sebesar 18,84% (13/69), Jawa Tengah 17,39% (12/69), dan Banten 15,94% (11/69). Persentase *E. coli*non patogen tertinggi dari Jawa Barat sebesar 25,55% (23/90), selanjutnya Jawa Timur dan Sulawesi Selatan masing-masing sebesar 20% (18/90) (Tabel 2).Hal ini disebabkan karena jumlah sampel dari Jawa Barat lebih banyak dari provinsi lainnya karena dilakukan sampling sebanyak 2 kali dan diambil dari 12 kandang, sedangkan di provinsi lain hanya di 6 kandang. Apabila dilihat berdasarkan jumlah isolat perprovinsi, maka sampel dari Sumatera Utara dan Lampung memiliki persentase *E.coli* patogen tertinggi yaitu masing-masing 50% (masing-masing 9/18).

Tabel 2 Persentase *E. coli* patogen dan *E. coli* non patogen dari tujuh provinsi

Propinsi	Kabupaten/ Kota	*E. coli*non patogen		*E. coli*patogen	
		Jumlah isolat	Persentase *E. coli* non patogen	Jumlah isolat	Persentase *E. coli* patogen
Sumatera Utara	Deli Serdang	9	10,00%	9	13,04%
Lampung	Bandar Lampung	9	10,00%	9	13,04%
Banten	Tangerang	7	7,78%	11	15,94%
Jawa Barat	Bogor, Bekasi	23	25,56%	13	18,84%
Jawa Tengah	Batang, Kota Semarang	6	6,67%	12	17,39%
Jawa Timur	Mojokerto, Kota Surabaya	18	20,00%	6	8,70%
Sulawesi Selatan	Maros, Kota Makassar	18	20,00%	9	13,04%
Total		90	100%	69	100%
Persentase dari total isolat *E. coli*		90/159 (56,60%)		69/159 (43,40%)	

*E. coli*termasuk bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan merupakan mikroflora normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Meskipun demikian terdapat beberapa serotipe *E. coli* bersifat patogen yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia dan hewan [17]. Media *Congo red* digunakan untuk mengetahui sifat patogenitas bakteri *E. coli* secara invitro. Bakteri *E. coli* yang bersifat patogen akan bereaksi positif dengan mengikat zat warna yang

terdapat dalam media *Congo red* sehingga koloni *E. coli* patogen akan berwarna merah. Kemampuan *E. coli* patogen ini mengikat warna dalam media *Congo red* ini dapat digunakan sebagai penanda fenotip untuk membedakan isolat*E. coli* yang bersifat invasif menyebabkan septikemia pada unggas dan *E. coli* non invasif yang bersifat komensal/flora normal[4]. Menurut Gjessing dan Berkhoff (1988), ada korelasi yang kuat antara ekspresi fenotip *E. coli* pada media *Congo red*dengan sifat virulensinya. *E. coli* non patogen yang tidak mampu mengikat zat warna yang terdapat dalam media *Congo red* sehingga koloni yang terbentuk berwarna putih[18].

Berkhoff dan Vinal (1985) menyatakan umumnyaisolat*E.coli* bereaksi positif pada media *Congo red*akan hilang kemampuan mengikat warna *Congo red* jika disubkultur pada media komplek seperti media *blood agar*[4]. Kemampuan bakteri mengikat warna pada media *Congo red* kemungkinan melibatkan polisakarida yang terdapat dalam dinding sel bakteri Gram negatif yang mengandung komponen polisakarida pada membran luarnya berupa *glukose β-1-3* (*β-D-glucan*), polisakarida ini bersifat kurang imunogenik sehingga digunakan bakteri untuk menghindar dari sistem imun inang [4].Infeksi *E. coli* patogen pada unggas umumnya bersifat sistemik dan menimbulkan bakteremia [5]. Menurut Brito *et al.*(2003) infeksi *E. coli* patogen berupa selulitis cenderung menginfeksi ayam broiler dan menyebabkan kerusakan karkas dan peningkatan angka afkir sampai 42,5%[6].Sehingga, secara ekonomi infeksi *E. coli* patogen pada unggas sangat merugikan peternak [44,22].

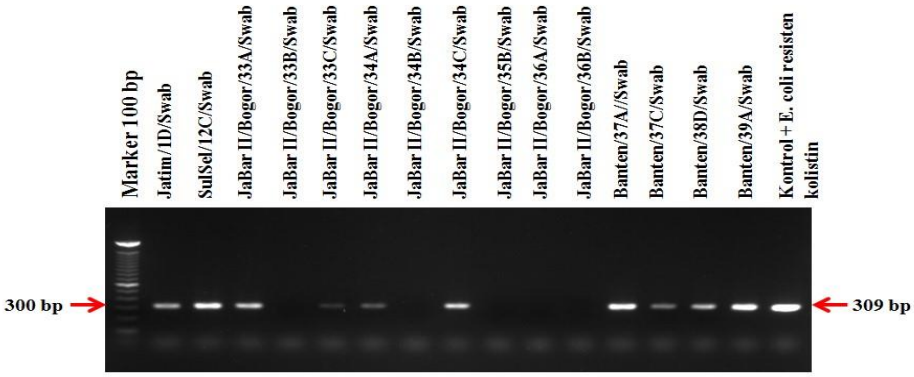
Hasil uji sensitifitas atau kepekaan terhadap antibiotik kolistin sulfat menunjukkan 34 dari 159 isolat resistan terhadap kolistin sulfat sehingga didapatkan prevalensi *E. coli* resistan kolistin adalah 21,38% (CI 95%; CL 15,73-28,39%). Nilai prevalensi ini termasuk tinggi dengan rincian 58,82% (20/34) ditemukan pada *E. coli* patogen dan 41,18% (14/34) pada *E. coli* non patogen. Berdasarkan patogen-non patogen didapatkan bahwa sebanyak 28,99% (20/69) *E. coli* patogen ternyata resistan terhadap kolistin dan dari isolat non patogen didapatkan 15,56% (14/90) resistan terhadap kolistin (Tabel 3). Jumlah *E. coli*resistan kolistin berdasarkan asal provinsi,paling banyak ditemukan pada isolat*E. coli* yang berasal dari Banten yaitu 72,22% (13/18), Sumatera Utara 55,56% (10/18), dan Jawa Barat 25,00% (9/36). Isolat *E. coli*resistan kolistin tidak ditemukan dari Provinsi Lampung dan Jawa Tengah.

Tabel 3 Hasil Uji*E. coli* resistan kolistin dan positif memiliki gen *mcr-1*

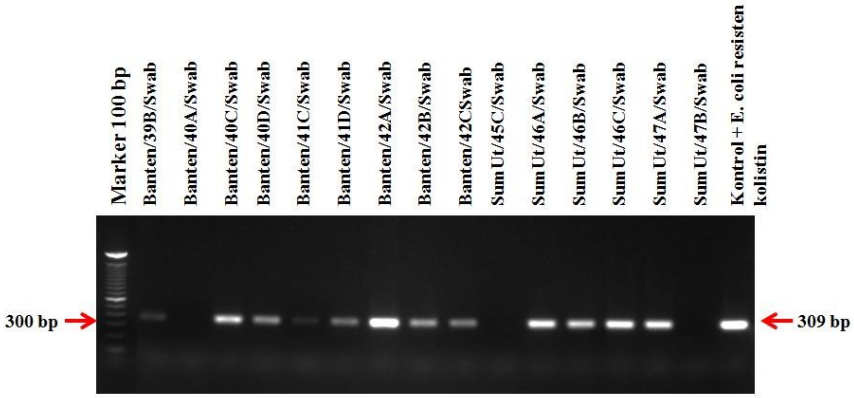
Provinsi	***E. coli* non patogen**			***E. coli* Patogen**			**Persentase *E. coli*resistan**	**Persentase *E. coli* resistan positif *mcr1***
	Jumlah isolat	**Jumlah resistan**	**Positif *mcr-1***	**Jumlah isolat**	**Jumlah resistan**	**Positif *mcr1***		

Sumatera Utara	9	5	3	9	5	4	55,55%	38,88%
Lampung	9	0	0	9	0	0	0%	0 %
Banten	7	6	5	11	7	7	72,22%	66,66%
Jawa Barat	23	1	0	13	8	4	25,00%	11,11%
Jawa Tengah	6	0	0	12	0	0	0%	0%
Jawa Timur	18	1	1	6	0	0	4,16%	4,16%
Sulawesi Selatan	18	1	1	9	0	0	3.70%	3.70%
Total	90	14	10	69	20	15		
Persentase	90/159 (56,60%)	14/90 (15,56%)	10/14 (71,42%)	69/159 (43,40%)	20/69 (28,99%)	15/20 (75,00%)	34/159 (21,38%)	25/159 (15,72%)

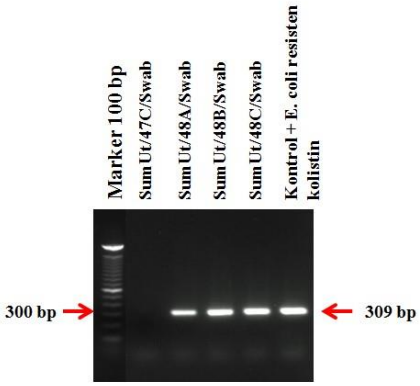
Bakteri *E. coli* resistan kolistin selanjutnya dideteksi keberadaan gen penyandi resistansi terhadap kolistin yaitu gen *mcr-1* yang tersaji pada Tabel 3 dan Gambar 1-3. Hasil deteksi gen *mcr-1* dari 7 provinsi dengan total 34 isolat *E. coli* resistan kolistin diperoleh sebesar 73,51% (25/34) yaitu ditemukan 25 isolat *E. coli* positif memiliki gen *mcr-1* dan 9 isolat lainnya negatif gen *mcr-1*. Hal ini menunjukkan keterkaitan genotip *mcr-1* dan fenotip resistan kolistin yang kuat. Dari hasil uji resistansi dan deteksi gen *mcr-1* didapatkan prevalensi *E. coli* resistan kolistin positif *mcr-1* adalah 15,72% (CI 95%; CL 10,88-22,18%).Deteksi gen *mcr-1* menggunakan metode PCR yang menunjukkan hasil amplifikasi gen *mcr-1* dengan panjang amplikon 309 bp (Gambar 1-3).



Gambar 1 Amplifikasi gen *mcr-1* (309 bp) penyandi resistansi kolistin pada plasmid *E. coli* (n=15). Sebanyak 10 isolat *E. coli* yang berasal dari usap kloaka menunjukkan hasil positif *mcr-1* dan 5 isolat menunjukkan hasil negatif *mcr-1*. Kontrol positif:*E. coli* resistan kolistin memiliki gen penyandi resistansi *mcr-1* (309 bp).



Gambar 2Amplifikasi gen *mcr-1* (309 bp) penyandi resistansi kolistin pada plasmid *E. coli* (n=15). Sebanyak 12 isolat *E. coli* yang berasal dari usap kloaka menunjukkan hasil positif *mcr-1* dan 3 isolat menunjukkan hasil negatif *mcr-1*. Kontrol positif:*E. coli* resistan kolistin memiliki gen penyandi resistansi *mcr-1* (309 bp).



Gambar 3 Amplifikasi gen *mcr-1* (309 bp) penyandi resistansi kolistin pada plasmid *E. coli* (n=4). Sebanyak 3 isolat *E. coli* yang berasal dari usap kloaka menunjukkan hasil positif *mcr-1* dan 1 isolat menunjukkan hasil negatif *mcr-1*. Kontrol positif:*E. coli* resistan kolistin memiliki gen penyandi resistansi *mcr-1* (309 bp).

Antibiotik kolistin sejak tahun 1959 digunakan untuk mengobati infeksi bakteri Gram negatif pada manusia. Namun, karena kolistin memiliki efek samping yaitu bersifat toksik terhadap saraf (neurotoksik) dan ginjal (nephrotoksik) sehingga penggunaannya di manusia mulai ditinggalkan dan diganti dengan antibiotik yang lebih aman dan efektif. Beberapa tahun terakhir ini banyak muncul resistansi atau berkurangnya efikasi antibiotika golongan*β*-laktam, aminoglikosida, atau kuinolon tidak efektif menyebabkan kolistin digunakan kembali dan menjadi obat pilihan terakhir untuk pengobatan infeksi *Multi Drugs Resistansi* bakteri Gram negatif [(20)]. Kolistin adalah antibiotik bersifat bakterisidal, memiliki spektrum sempit yang sangat efektif untuk membunuh bakteri Gram negatif yaitu sebagian besar *Enterobacteriaceae*

termasuk *E. coli, Enterobacter, Salmonella, Shigella,*dan *Klebsiella*[33]. Kolistin sulfat sebagai obat pilihan terakhir untuk pengobatan infeksi oleh bakteri Gram negatif lain yang multiresistan seperti *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacteriaceae* multiresistan karbapenemase [17, 8,11,29].

Kolistin yang bersifat kationik akan berinteraksi dan berikatan dengan lipopolisakaridabagian hidrofobik dari lipid A yang bermuatan anionik sehingga merusak kestabilan membran sel dan menyebabkan isi sel bakteri keluar dan bakteri menjadi mati [30]. Penggunaan kolistin di bidang kedokteran hewan banyak digunakan untuk pencegahan, pengobatan, metafilaksis, dan meningkatkan pertumbuhan[15,37]. Kolistin sering ditambahkan pada pakan dengan dosis rendah dan digunakan sebagai *growth promoter* di beberapa negara yangpenggunaannya diizinkan[21]. Pada babi dan sapi, kolistin terutama digunakan untuk mengendalikan infeksi enterik yang disebabkan oleh *E. coli* dan *Salmonella*[8, 37].

Perkembangan resistansi mikroba menjadi proses yang kompleks karena salah satunya berhubungan dengan keberadaan gen penyandi resistansi yang ditemukan di dalam material genetik pada plasmid atau kromosom. Integron adalah genetik material yang bertanggung jawab menangkap gen resistan dan menyebarkannya melalui *genetic mobile elements* seperti transposon dan plasmid. Keberadaan integron dapat dideteksi melalui amplifikasi gen *integrase* (*intl1, intl2, intl3*) [2].

Gen *mcr-1*dilaporkan pertama kali oleh Liu *et al.* (2016) yang menemukan gen tersebut dari *E. coli* yang diisolasi tahun 2012–2014 di Cina, isolat *E. coli* berasal dari sampel daging mentah sebesar 15% (78/523), dari sampel hewan 21% (166/804), dan dari sampel pasien rawat inap 1% (16/1322)[25]. Analisis retrospektif menunjukkan gen *mcr-1* telah bersirkulasi sejak tahun 1980-an dan isolat paling awal berasal dari ayam [39]. Gen *mcr-1* terletak pada plasmid yang mengkode enzim kelompok *phosphoethanolamine transferase*(pEtN). Ekspresi enzim ini pada *E. coli*akan menghasilkan penambahan molekul pEtN pada lipid A sehingga kolistin tidak dapat berikatan pada lipid A dan tidak dapat masuk ke dalam sel bakteri sehingga bakteri menjadi resistan[25].

Beberapa data penelitian menunjukkan gen *mcr-1*banyak bersirkulasi pada isolat resistan kolistinyang berasal dari sampel unggas. Namun, gen *mcr-1* tidak selalu ditemukan pada isolat yang resistan kolistin secara fenotip, karena resistansi kolistin dapat juga terjadi karena adanya novel *mcr-like* gen atau resistansi jalur kromosom yang mungkin terlibat[15,36].Hal ini ditemukan dari hasil pengkajian ini yaitu terdapat 9 isolat *E. coli* yang resistan kolistin secara fenotip namun tidak ditemukan gen *mcr-1*. Resistansi terhadap kolistin pada sebagian besar bakteri Gramnegatif melalui jalur kromosomyang melibatkan penambahanmolekul 4-amino-4-deoxy-l-

arabinose (L-Ara4N) dan pEtN pada lipid A.Penambahan molekul tersebut menurunkan afinitas lipid A sehingga kolistin tidak dapat berikatan dengan lipid A dan tidak dapat merusak membran sehingga bakteri menjadi resistan[30].Mekanisme resistansi lainnya melalui modifikasi spesifik pada porin membran luar, meningkatkan pengaturan MexAB-OprM dan akhirnya terjadi ekspresi berlebih pada sistem pompa *efflux* sehingga kolistin dikeluarkan dari sel bakteri[31].

Resistansi terhadap kolistin dapat juga terjadi tanpa paparan antibiotik kolistin seperti yang ditemukan pada isolat pasien dari Huashan Hospital di Cina dan semua isolat berasal dari pasien yang tidak mendapatkan pengobatan antibiotik kolistin. Pada 68 isolat *Klebsiella pneumonia* ditemukan 3 isolat *K. pneumonia* yang resistan kolistin dan dari 14 isolat *Enterobacteriaceae* ditemukan 1 isolat *Enterobacter cloacae*resistan terhadap kolistin[9].Gen *mcr-1*telah ditemukan secara luas di dunia, pada bakteri *Salmonella* yang resistan kolistin, *mcr-1* ditemukan sebanyak 22,7% (5/22) di Cina, Italia 15,4% (2/13), dan Belanda 20,8% (11/53) [7,24,27].Adapunpada penelitian Lettini *et al.* (2016),isolat *Salmonella* resistan kolistin yang didapatkan dari peternakan unggas dan babi di Vietnam tidak ditemukan adanya gen *mcr-1*.

Wang *et al.* (2018),melakukan kajian kompilasi terhadap 457 data global 2008-2016 dari isolat positif memiliki gen *mcr-1* dari 31 negara, dengan rincian berikut: 110 data *whole-genome sequencing* (WGS) dari Cina, 195 data isolat dari publikasi yang sekuennya terdapat di NCBI GenBank, dan 152 sekuen dari NCBI *Short Read Archive* (SRA). Hasilnya ditemukan jumlah sampel positif *mcr-1* tertinggi yaitu 222 sampel berasal dari Cina dengan 45% sampel berasal dari Provinsi Shandong, 58 sampel dari Vietnam, dan 25 sampel dari Jerman. Isolat yang positif *mcr-1* tertinggi berasal dari bakteri *E. coli* (411), *Salmonella enterica* (29), *Klebsiella pneumonia* (8), *Escherichia fergusonii* (2), *Kluyvera ascorbate* (2), *Citrobacterbraakii* (2), *Cronobacter sakazakii*(1), dan *Klebsiella aerogenes* (1). Informasi terkait sumber sampel diperoleh 222 berasal dari hewan, 108 dari manusia, dan 30 sampel lingkungan [43].

Adanya gen penyandi resistansi *mcr-1* pada bakteri *E. coli*resistan kolistinyang berasal dari sampel broiler hidup (usap kloaka)pada kajian ini serta ditemukannya gen *mcr-1*dari hewan dan manusia oleh Liu *et al.*(2016), menimbulkan kekhawatiran akan semakin sulit penangan kasus infeksi bakteri Gram negatif pada manusia[25]. Menurut Yi *et al.*(2017) hingga sekarang *E. coli* merupakan bakteri pembawa utama gen *mcr-1* yang merupakan gen penyandi resistansi antibiotik kolistin yang mampu mentransfer materi genetik tersebut secara horizontal antar spesies bakteri[46].

Keberadaan *E. coli* patogen resistan antibiotik dari sampel feses dan tanah kemungkinan dapat mengkontaminasi rantai makanan dan menjadi sumber bahaya bagi kesehatan masyarakat, bakteri yang resistan dapat secara berkelanjutanmencemari lingkungan melalui

feses dan dapat menyebabkan infeksi serius bakteri resistan pada manusia [32]. Bakteri *E. coli*resistan dapat juga menyebar ke manusia melalui kontak langsung manusia dengan hewan terinfeksi dan *E. coli* resistan dapat berperan sebagai “pemindah” gen resistan terhadap bakteri lainnya [1].

Hasil deteksi gen *mcr-1* dari 7 provinsi diperoleh keberadaan gen *mcr-1* pada isolat *E. coli* resistan kolistin sebesar 73,53% (25/34).Persentase tertinggi ditemukan *E.coli*resistan kolistin dan memiliki gen *mcr-1* dari Provinsi Banten (66,66%), berikutnya Sumatera Utara (38,88%), Jawa Barat (11,11%), Jawa Timur (4,16%), Sulawesi Selatan (3,70%), sedangkan dari Provinsi Lampung dan Jawa Tengah negatif isolat *E. coli* resistan kolistin dan negatif gen *mcr-1.* Tingginya nilai keterkaitankeberadaan gen resistan *mcr-1*ini menunjukkan hubungan yang *linier* antara hasil uji resistansi secara fenotip dan keberadaan elemen genetik yaitu gen penyandi resistansi *mcr-1* yang terekspresi. Hasil kajian ini secara keseluruhan memberikan gambaran bahwa hewan pada peternakan dapat menjadi reservoir/sumber penularan bakteri resistan melalui perpindahan gen resistan atau terinfeksi *E. coli* resistan ke hewan, manusia, bakteri lain dan lingkungan. Dari data ini menunjukkan bahwa keputusan pemerintah Indonesia untuk melarang peredaran kolistin untuk digunakan pada hewan per Juli 2020 sudah tepat. Namun demikian, surveilans resistansi kolistin masih perlu dilanjutkan untuk melihat efektifitas peraturan ini dan melihat titik-titik kritis lainnya guna mencegah penyebaran dan perbanyakan *E. coli* resistan kolistin dari hewan ke manusia. Serta perlunya pengawasan obat hewan dalam rangkan pemastian bahwa sudah tidak ada lagi kolistin yang digunakan di hewan produksi juga masih perlu dilakukan,

KESIMPULAN

Hasil isolasi dari sampel usap kloaka diperoleh 159 isolat *E. coli* dan dari sampel pakan dan air baku tidak ditemukan isolat *E. coli*. Hasil uji patogenitas diperoleh 69 (43,40%) adalah *E. coli* patogen dan 90 (56,60%) adalah *E. coli* non patogen. Prevalensi *E. coli* resistan kolistin ditemukan cukup tinggi yaitu 21,38% (CI 95%; CL 15,73-28,39%) dan prevalensi *E. coli* resistan kolistin positif *mcr-1* adalah 15,72% (CI 95%; CL 10,88-22,18%). Keterkaitan genotipik *mcr-1* dan fenotipik *E. coli* resistan kolistin cukup tinggi, hal ini ditunjukkan 73,53% *E. coli* resistan kolistin memiliki gen *mcr-1*. Persentase resistansi kolistin dan keberadaan gen *mcr-1* berdasarkan lokasi tertinggi ditemukan dari Provinsi Banten, berikutnya Sumatera Utara, dan Jawa Barat. Keberadaan gen *mcr-1* yang terdapat di plasmid memberikan peluang terjadinya penyebaran resistansi terhadap bakteri komensal dan bakteri patogen lainnya. Penyebaran

resistansi ini dapat menyebabkan infeksi semakin sulit diobati dan periode infeksi semakin panjang yang akhirnya akan menurunkan ketahanan dan produktivitas ternak. Beberapa upaya untuk menurunkan penyebaran dan dampak resistansi melalui peningkatan biosekuriti dan menerapkan management peternakan yang baik, menerapkan higiene dan sanitasi saat mengolah bahan pangan asal hewan serta menggunakan antibiotik hanya untuk tindakan terapi.

SARAN

Kegiatan pengkajian ini masih membutuhkan kegiatan lanjutan dengan lingkup kajian/penelitian yang lebih luas lagi yaitu kajian dengan jenis bakteri atau agent biologi yang berbeda, dan golongan antibiotik, sumber sampel serta gen penyandi resistan yang berbeda sehingga Indonesia memiliki data yang komprehensif khususnya di bidang Kesehatan Hewan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Akond M. 2009. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Am J Environ Sci*. 5(1):47–52. https://doi.org/10.3844/ajessp.2009.47.52.
2. Awad A, Arafat N, Elhadidy M. 2016. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 15(1):59. https://doi.org/10.1186/s12941-016-0174-9.
3. Bahera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, Farooque K, Sharma VMisra MC. 2010. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. *Int J Infect Dis.* 14:596-601.
4. Berkhoff, H. A. and A. C. Vinal. 1985. Congo Red Medium to Distinguish Between Invasive and Non invasive *Escherichia coli* Pathogenic for Poultry. *Avian Disease*30(1):117-121.
5. Bisping W, Amtsberg GA. 1988. Color Atlas for The Diagnosis of Bacterial Pathogen in Animal. Berlin: *Paul Parey Scientific Publishers*. Pp: 160 – 168.
6. Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC. 2003. Virulence Factors and Clonal Relationship Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *J Infect Immun.* 71:4175 – 4177.

7. Carnevali C, Morganti M, Scaltriti E, Bolzoni L, Pongolini S, Casadei G. 2016. Occurence of *mcr-1* Colistin-Resistant *Salmonella* isolates recovered from human and animals in Italy, 2012-2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 60:7532–7534.
8. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K,Holm A, Jukes H, Liebana E, Navas AL, Mackay D *et al.* 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents*. 46:297–306.
9. Chen S, Hu F, Zhang X, Xu X, Liu Y, Zhu D, Wang H. 2011. Independent emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates without colistin treatment. *J Clin Microbiol*. 49:4022–4023.
10. [CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. M100S: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 26th ed. Wayne (PA, US): CLSI. Pp: 52-54.
11. Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. 2009. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies fot the use of antimicrobials in food production animals. *Food Safety CID* 49:132-141.
12. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. 2015. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapanem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumanni* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*59(8):4625-30.
13. De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonellaenterica* serotype Enteritidis in poultry. *J Appl Environ Microbiol*. 69:3456–3461.
14. [EUCAST] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1.
15. [EMA] European Medicines Agency. 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. 30 Churchill Place. Canary Wharf London E14 5EU. United Kingdom (UK). Terdapatpadahttps://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en.pdf. [diunduh 13 Februari 2019]
16. Ewings WH. 1986. Identification of Enterobacteriacea 4th Ed. Elsevier, New York.

17. Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin the Revival of Polymixins for the Management of Multidrug-Resistant Gram Negative Bacterial Infection. *Clin Infect Dis.* 40:1333-1341.
18. Gjessing KM and Berkhoff HA. 1988. Experimental Reproduction of Airsacculitis and Septicemia by Aerosol Exposure of 1-Day-Old Chicks Using Congo Red Positive *Escherichia coli. Avian Disesases* 30(6):473-478.
19. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichiacoli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 140: 360–370. 2.
20. Kasiakou SK, Michalopoulos A, Soteriades ES, Samonis G, Sermaides GJ, Falagas ME. 2005. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:3136–46.
21. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, Madec JY, Jouy E. 2013. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe.*Elsevier* 42(4):379-383. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012. Epub 2013 Sep 26.
22. Knobl T, GomesTAT, Veira MAM, Bottino JA, Ferreira AJP. 2006. Occurance of adhesin encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeder with salpingitis and chick with omphalitis. *Braz J Microbiol.* 37.
23. Lettini AA, Vo Than T, Marafin E, Longo A, Antonello K, Zavagnin P, Barco L, Mancin M, Cibin V, Morini M, Dang TS, Thi MN, Trung TP, Le H, L, Duc LN, Ricci AT. 2016. Distribution of *Salmonella* serovars and antimicrobial susceptibility from poultry and swine farms in central Vietnam. *Zoonoses Public Health*. 63:569–576.
24. Li XP, Fang LX, Song JQ, Xia J, Huo W, Fang JT, Liao XP, Liu YH, Feng Y, Sun J. 2016. Clonal spread of *mcr-1* in PMQR-carrying ST34 *Salmonella* isolates from animals in China. *Sci Rep*. 6:38511. doi:10.1038/srep38511.
25. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X *et al*. 2016. 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.* 16:161–168.
26. Lutful Kabir SM. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int J Environ Res Public Health*7(1):89–114. https://doi.org/10.3390/ ijerph7010089.
27. [MARAN] Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in. 2016. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance

among medically important bacteria in The Netherlands in 2015. Bergen: Dutch Foundation of the Working Party on Antibiotic Policy (USAP). Terdapat padahttp://www.usap.nl. [diunduh 25 Agustus 2020].

28. Morales AS, Araujo JF, Moura Gomes VT, Costa ATR, Rodrigue DP, Ferreira TSP, … Moreno AM. 2012. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* strains isolated from swine in Brazil. *Sci World J*: 109795.
29. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. 2016. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 22 (6):1038-1043.
30. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *FrontiersMicrobiol*. 5(249). doi: 10.3389/fmicb.2014.00643.
31. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *J Mol Microbiol.* 68:223–40.
32. Parul S, Bist B, Sharma B, Jain U. 2014. Virulence associated factors and antibiotic sensitivity pattern of Escherichia coli isolated from cattleand soil. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916. Terdapat padawww.veterinaryworld.org/Vol.7/May-2014/20.pdf. doi: 10.14202/vetworld.2014.369-372. [diunduh 30 September 2020].
33. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *JClin Microbiol Rev*. 30:557–596.
34. Palupi MF, Wibawan IWT, Sudarnika E, Maheshwari H, Darusman HS. 2019. Prevalence of *mcr-1*colistin resistance gene in *Escherichia coli* along broiler meat supply chain in Indonesia. *Biotropia* (26)2:143-153. DOI: http://dx.doi.org/10.11598/btb.2019.26.2.1054
35. Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL, Domínguez L. 2016. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *J Res in Vet Sci*. 105:134–135.
36. Raghavan V. 1997. The concept of quality control to improve feed quality for poultry production. Asia Focus Proceding VIV Seminars on Poultry and Pig Production. *Misset International*. Pp:57-59.

37. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. 2016. Colistin in pig production: chemistry, mechanism antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers Microbiol*. 7(1789). doi: 10.3389/fmicb.2016.01789.
38. Ronsengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ. 2009. Association between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes and virulence genes of faecal *E. coli* isolates of healthy grown finish pigs. *Applied Environ. Microb*. 75:1373-1380.
39. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. 2016. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infect Dis*. 16(293). doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X.
40. [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2008. Metode Pengujian Cemaran Mikroba dalam Daging, Telur dan Susu serta Hasil Olahannya. SNI No. 2897:2008. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
41. SuwitoW. 2010. Monitoring *Salmonella sp* dan *Escherichia coli* dalam bahan pakan ternak.*Buletin Peternakan* 34(3):165-168.
42. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, Lammens C, Zarkotou O, Pournaras S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2018. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 37:345-53.
43. Wang R, Lucy van Dorp, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, Jin L, Zhang Q, Liu Y, Rieux A, Schneiders TD, Weinert LA, Iqbal Z, Didelot X, Wang H, Balloux F. 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1. Nature Comunication* 9:1179. doi: 10.1038/s41467-018-03205-z.
44. Wooley RE, GibbsPS, Brown TP, Maurer JJ. 2000. Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis.* 44:318 – 324.
45. [OIE] World Organization for Animal Health. 2016. Terrestrial animal health code 25th ed. Paris (FR): OIE.
46. Yi L, Wang J, Gao Y, Liu Y, Doi Y, Wu R, Zeng Z, Liang Z, Liu JH. 2017. Mcr-1 Harboning Salmonella enteric Serovar Typhimurium Sequence Type 34 in Pigs. *China. Emerg Infect Dis.*2392:291-295.