

UJI RESISTENSI ANTIBIOTIK AMPICILLIN PADA BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* YANG DI ISOLASI DARI DARI BEBERAPA PETERNAKAN DI SURABAYA

***Ampicillin Antibiotic Resistance test of Escherichia coli isolated from
Several poultry in Surabaya***

Khoiru Indana^{1*}, Mustofa Helmi Effendi² and Soeharsono³

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman, Samarinda, 75123

²Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

³Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Airlangga

e-mail : khoiru.indana20@gmail.com

Diterima September 2019; diterima pasca revisi Desember 2019
Layak diterbitkan Februari 2020

ABSTRAK

Resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan suatu yang alami. Bahaya resistensi antibiotik merupakan salah satu masalah yang terjadi juga pada dunia peternakan sehingga mengakibatkan kerugian bagi para peternak. Terjadinya resistensi antibiotika ini disebabkan pemakaian antibiotika pada hewan sebagai pemacu pertumbuhan yang mempunyai kontribusi terjadinya resistensi antibiotika. Ampisilin salah satu jenis antibiotik golongan penisilin yang dilaporkan resisten terhadap *Escherichia coli*. Selain harganya murah, ampicillin sangat mudah didapat. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi *Escherichia coli* yang diisolasi dari daging ayam pada peternakan di Surabaya yang resisten terhadap Ampisilin. Uji resistensi Ampicillin terhadap *Escherichia coli* menggunakan metode Kirby-Bauer. Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi dari 40 sampel didapatkan 13 isolat yang dinyatakan resisten *Escherichia coli* atau sebanyak 32,5 %.

Kata kunci : *Ampicillin, Daging Ayam, Escherichia coli, Metode Kirby-Bauer*

ABSTRACT

Bactery resistance toward antibiotic is a natural. The danger of antybiotics resistance is one of the problem that also occurs in the world of livestock, resulting in losses for breeders. The occurance of antibiotic resistance is due the use of antibiotics in animals as growth promoters which contribute to antibiotic resistance. Ampicillin is a penicillin class of antibiotics that is reportedly resistant to *Escherichia coli*. Beside being cheap, ampicillin is easy to get. This study aims to isolate and identification *Escherichia coli* that resistance to the antibiotic ampicillin were isolated from chicken meat in Surabaya. Ampicillin resistance test use Kirby-Bauer method. Chicken meat samples were taken from four poultry in Surabaya (40 samples). Based on the results of the isolation and identification of 40 samples were obtained 13 isolates positive for *Escherichia coli*, or 32.5%. Sensitfitas test showed 13 positive isolates were resistance to the antibiotic ampicillin, or as much as 100%.

Keywords : *Ampicillin, Chicken meat, Escherichia coli, Kirby-Bauer method*

Pendahuluan

Escherichia coli merupakan bakteri yang secara normal dapat tumbuh pada saluran pencernaan tetapi dalam keadaan tertentu dapat bersifat patogen serta mampu menyerang hewan maupun manusia. Bakteri ini merupakan bakteri *environment contaminant* yaitu bakteri cemaran lingkungan. Kontaminasi ini terjadi dikarenakan kurangnya sanitasi yang baik dari manajemen peternakan. Bakteri ini sering kali mengkontaminasi produk asal hewan antara lain daging ayam.

Penggunaan antibiotik untuk mengatasi penyakit pada unggas saat ini masih merupakan pilihan terbaik bagi peternak ayam. Pencampuran antibiotik dosis ringan dalam pakan juga telah dilakukan dalam dunia peternakan dengan tujuan peningkatan efisiensi pakan (Tabbu, 2000).

Resistensi antibiotika terhadap bakteri patogen telah menjadi masalah di seluruh dunia. Terjadinya resistensi antibiotika ini disebabkan pemakaian antibiotika yang tidak tepat untuk pengobatan pada manusia serta pemakaian antibiotika pada hewan sebagai pemacu pertumbuhan yang mempunyai kontribusi terjadinya resistensi antibiotika baik pada manusia maupun hewan (Barton, 2000).

Meningkatnya penggunaan antibiotik *ampicillin*, memacu meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik tersebut. Mekanisme utama resistensi bakteri Gram-positif dan Gram-negatif terhadap antibiotik *ampicillin* yakni dengan menghasilkan enzim betalaktamase, yang berperan memotong cincin betalaktam, sehingga aktivitas antibakterinya hilang. Enzim ini membuka cincin betalaktam dari *ampicillin* serta menghilangkan daya antimikrobanya (Costa *et al.*, 2010). Penelitian ini menggunakan antibiotik *ampicillin*, yang akan dilakukan uji sensitifitas untuk mengetahui kepekaan *Escherichia coli* terhadap *ampicillin* tersebut

Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2015 hingga Juni 2015 di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Tanah dari lahan pasca tambang pasir dianalisis oleh Balai Penelitian Tanah, Bogor. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging ayam yang diambil dari beberapa peternakan dan pengepul ayam di Surabaya. Bahan lainnya adalah bahan yang digunakan dalam identifikasi *Escherichia coli* antara lain, *Brilliant Green Bile Broth* (BGBB) (E. Merck, Darmstadt, Germany), *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) (E. Merck, Darmstadt, Germany), *Buffer Pepton Water* (BPW) (E. Merck, Darmstadt, Germany), aquadest, pepton water 1%, reagen *kovach*. Bahan yang digunakan untuk uji sensitifitas antibiotik antara lain Mc. Farland 1, NaCl fisiologis, *Mueller Hinton Agar* (MHA) (E. Merck, Darmstadt, Germany), antibiotik *ampicillin* siap dipakai dalam bentuk cakram.

Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel meliputi tabung reaksi, kapas, pipet hisap, termos (ice box). Peralatan yang digunakan untuk identifikasi *Escherichia coli*, ekstraksi DNA, amplifikasi dengan Polymerase Chain Reaction, dan elektroforesis meliputi cawan Petri, Erlenmeyer, tabung reaksi, kapas, kompor, ose, bunsen, tabung Durham.

Penelitian ini termasuk penelitian eksploratif laboratorik yaitu penelitian yang bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai gejala tertentu atau dugaan yang sifatnya masih baru dengan memanfaatkan alat-alat laboratorik (Alfiasari, 2012)

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel menggunakan metode Purposive Sampling yaitu cara penarikan sampel yang dilakukan dengan memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti (Kuntjojo, 2009).

Sampel daging ayam diambil dari beberapa peternakan di Surabaya dengan kriteria antara lain: a). kandang tidak benar-benar terjaga kebersihannya, b). tidak pernah diberikan formalin sebelumnya. Pengambilan sampel daging ayam pada pagi hari pukul 05.00-06.00 WIB. Pada setiap peternakan diambil 10 sampel daging ayam pada bagian paha. Total daging ayam yang digunakan sebagai sampel adalah 40 sampel. Tiap sampel daging ayam ditempatkan pada plastik clip, kemudian dimasukkan ke dalam termos (*ice box*).

Identifikasi *Escherichia coli*

Masing-masing suspensi daging ayam 10% ditanam pada media *Brilliant Green Bile Broth* (BGBB) kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung gas pada tabung Durham dan perubahan warna hijau menjadi hijau keruh. Setelah positif kemudian ditanam pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dengan cara streak dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni khas *Escherichia coli* pada media EMBA metalik. Koloni khas *Escherichia coli* yang tumbuh di EMBA ditanam lagi di Pepton Water 1 % dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pepton Water 1 % yang sudah diinkubasi selanjutnya ditetesi dengan reagen Kovach sebanyak dua atau tiga tetes. Uji positif *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan Pepton Water 1 % (Prawesthirini dkk., 2009).

Uji Sensitifitas

Uji sensitifitas antibiotik kali ini menggunakan metode Kirby-Bauer yang menggunakan *Agar disk diffusion* menghasilkan kategori yang bersifat kualitatif dengan penilaian *sensitive*, *intermediate* dan *resistant* (Lopez-Lozano *et al.*, 2000). Cara kerja dalam uji sensitivitas dijelaskan dibawah ini;

a. Kultur Kuman

Biakan kuman yang diperoleh dari koloni yang terdapat pada media

EMBA ditanam pada tabung reaksi yang berisi 8 ml *NaCl fisiologis*, dilakukan homogenisasi menggunakan vortex sampai didapatkan kekeruhan yang sama dengan standart *McFarland 1*.

b. Uji Sensitifitas

Penanaman pada lempeng agar dilakukan dengan mengambil isolat *Escherichia coli* sebanyak 1-2 koloni pada media EMBA menggunakan ose kemudian dimasukkan kedalam *NaCl fisiologis* yang sudah diuji kekeruhannya dengan standart *McFarland 1*, kemudian diambil sebanyak 0,2 ml lalu diusapkan perlahan pada seluruh permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kuman dibiarkan menempel pada media selama 15 menit, lalu cakram antibiotik ampicillin diletakkan diatas media *Mueller Hinton Agar* (MHA) tersebut. Cakram agak sedikit ditekan pada permukaan agar obat dapat meresap dengan baik. Biakan bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

c. Pembacaan hasil

Daerah hambatan antibiotik terhadap pertumbuhan kuman diukur dengan menggunakan penggaris dengan satuan mm.

Analisis Data

Data yang ada secara kualitatif dipaparkan secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Identifikasi *Escherichia coli*

Penelitian ini telah berhasil mengisolasi 13 bakteri *Escherichia coli* dari 40 sampel daging ayam yang diisolasi dari 4 peternakan di Surabaya. Adanya bakteri *Escherichia coli* pada daging ayam dapat membuat daging ayam tidak memenuhi persyaratan cemaran bakteri yang telah ditetapkan oleh SNI 7388-2009.

Sampel daging ayam yang dibiakan berwarna hijau keruh dan menghasilkan gas pada media BGBB dapat dikatakan

terdapat bakteri koliform, Kemudian bakteri yang ada di media BGGB ditanamkan pada media EMBA. Gambaran media BGGB yang



Gambar 1. Media BGGB berwarna hijau keruh dan terdapat gas.

Pada media EMBA terdapat koloni terpisah berwarna hijau metalik, dapat dikatakan bahwa adanya dugaan bakteri *Escherichia coli*. Bakteri tersebut dapat membentuk warna hijau metalik karena adanya reaksi dengan *methylene blue* Gambaran warna hijau metalik dapat dilihat pada Gambar 2.

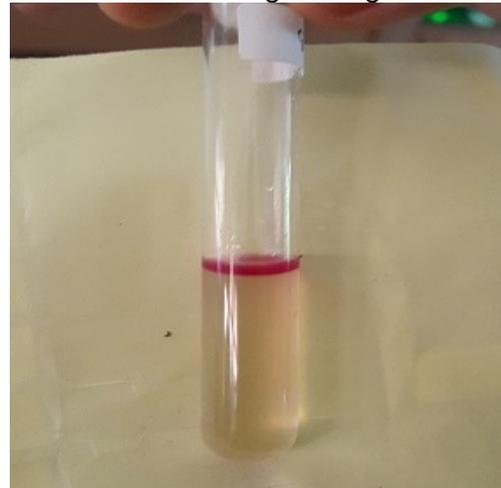


Gambar 2. Media EMBA yang ditumbuhi *Escherichia coli*. Koloni berwarna hijau metalik yang berarti dugaan *Escherichia coli*.

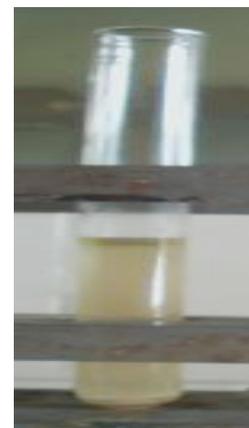
Koloni terpisah tersebut kemudian dikonfirmasi lagi dengan menggunakan uji Indol, yaitu dengan cara menanamkan pada media *Buffer*

mengalami perubahan warna hijau keruh dapat dilihat pada Gambar 1.

Pepton Water 1% pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji indol positif terlihat dari adanya cincin warna merah pada permukaan media *Pepton Water* 1% setelah ditetesi dengan reagen *kovach*.



Gambar 3 (a)



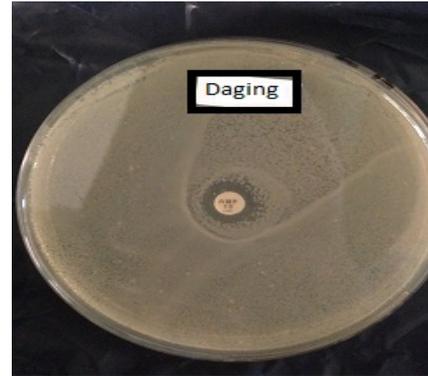
Gambar 3 (b)

Pada Gambar 3 (a) menunjukkan bahwa dari sampel *suspect Escherichia coli* yang diambil dari koloni yang berwarna hijau metalik pada media EMBA menunjukkan hasil indol positif. Gambar 3 (b) menunjukkan hasil indol negatif yang digunakan sebagai kontrol.

Hasil Uji Sensitifitas

Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi dari 40 sampel didapatkan 13 isolat yang dinyatakan positif *Escherichia coli* atau sebanyak 32,5 %.

Isolat tersebut selanjutnya dilakukan uji sensitifitas terhadap antibiotik *ampicillin* 10 µg. Apabila terdapat koloni bakteri pada zona hambatan antibiotik, maka pengukuran dilakukan dari jarak koloni terdekat dengan diameter zona hambatan. Uji Resistensi yang digunakan adalah metode *agar diffusion* (difusi agar) dimana metode ini didasarkan pada difusi antibiotik dari *paper disk* yang dipasang horizontal pada lapisan agar padat dalam cawan petri sehingga mikroba yang ditumbuhkan dihambat pertumbuhannya pada daerah berupa lingkaran atau zona yang disekeliling *paper disk* yang mengandung larutan antibiotik. metode ini menghasilkan kategori kualitatif dengan penilaian *sensitif*, *intermediete* dan *resisten*. Ukuran diameter zona bening *Sensitif* ≤ 17 mm, *intermediete* ≤ 14 mm dan *resisten* ≤ 12mm. (CLSI, 2011).



Gambar 4. Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik *Ampicillin* (Keterangan: AMP (*Ampicillin*)).

Pada penelitian ini, tingkat terjadinya pencemaran bakteri *Escherichia coli* yaitu 32,5%. Dari 40 sampel yang diujikan terdapat 13 pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang ditunjukkan oleh adanya koloni berwarna hijau metalik dan kemudian pada pengujian indol dengan penambahan reagen kovach didapatkan cincin indol yang berwarna merah muda yang menandakan positif *Escherichia coli*.

Adanya bakteri *Escherichia coli* menunjukkan bahwa daging ayam tersebut terkena cemaran oleh feses ayam pada saat pemotongan di sebuah peternakan karena pada dasarnya *Escherichia coli* merupakan indikator adanya kontaminasi fekal. Secara umum penyebab dari banyaknya bakteri *Escherichia coli* yang ditemukan dapat dikarenakan oleh beberapa faktor.

Faktor pertama terjadinya cemaran adalah tidak terjaganya kebersihan pada lingkungan peternakan. Peternak sangat kurang memperhatikan kondisi kebersihan lingkungan (Hadiwiyoto, 1994). Lingkungan peternakan bisa berasal dari pakan, air, tanah yang tercemar oleh kotoran hewan.

Faktor yang kedua adalah kondisi kebersihan dari peternak itu sendiri. Terkadang peternak memakai pakaian yang kotor, bahkan menggunakan pakaian yang sudah lama tidak dibersihkan atau dicuci pada

No.	Sampel	<i>Escherichia coli</i> yang resisten	Sumber
1.	Daging Ayam A1 - A10	0	Keabraon Barat
2.	Daging Ayam B1 - B10	0	Rungkut
3.	Daging Ayam C1 - C10	9	Tandes
4.	Daging Ayam D1 - D10	4	Tidar

Table 1. Sumber Peternakan di Surabaya.

No	Sampel	<i>Ampicillin</i> 10 µg
1	Daging Ayam C1	6 (R)
2	Daging Ayam C2	5 (R)
3	Daging Ayam C3	7 (R)
4	Daging Ayam C4	8 (R)
5	Daging Ayam C6	6 (R)
6	Daging Ayam C7	4 (R)
7	Daging Ayam C8	5 (R)
8	Daging Ayam C9	9 (R)
9	Daging Ayam C10	6 (R)
10	Daging Ayam D1	8 (R)
11	Daging Ayam D4	8 (R)
12	Daging Ayam D5	7 (R)
13	Daging Ayam D8	6 (R)

Tabel 2. Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik (R) adalah Resisten

saat pemotongan ayam (Lukman, 1986).

Kurang bersihnya peralatan merupakan faktor kontaminasi yang ketiga. Buruknya sanitasi ini dikarenakan pencucian alat yang kurang bersih dan penyimpanan peralatan yang sembarangan. Alat-alat tersebut hanya dicuci dengan air biasa yang seharusnya dicuci dengan air panas atau dengan bahan kimia. Kontaminasi sering disebabkan karena peralatan pada waktu pemerahan dan air pencuci alat yang kotor tidak terjaga kebersihannya (Handiwiwoto, 1994).

Faktor yang keempat adalah sanitasi kandang yang buruk. Sanitasi kandang yang baik dapat meminimaliskan adanya cemaran yaitu dengan cara membersihkan kandang secara rutin pada saat pemotongan. Kondisi kandang yang kotor seperti adanya sisa dari pakan ayam serta kotoran ayam yang tidak dibersihkan dapat mengundang adanya lalat di kandang.

Penelitian ini berhasil mengisolasi *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik *ampicillin*. Sebanyak 13 sampel resisten terhadap *Ampicillin* 10 µg dengan ukuran zona hambat ≤ 12 mm.

Uji Resistensi yang digunakan adalah metode *agar diffusion* (difusi agar) dimana metode ini didasarkan pada difusi antibiotik dari *paper disk* yang dipasang horizontal pada lapisan agar padat dalam cawan petri sehingga mikroba yang ditumbuhkan dihambat pertumbuhannya pada daerah berupa lingkaran atau zona yang disekeliling *paper disk* yang mengandung larutan antibiotik. metode ini menghasilkan kategori kualitatif dengan penilaian *sensitif, intermediete dan resisten* (Anand *et al.*, 2009).

Mekanisme terbentuknya zona hambatan yaitu *paper disk* yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada pembenihan padat yang telah ditanami dengan biakan organisme yang diperiksa. Setelah diinkubasi, garis tengah

daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan obat terhadap organisme yang diperiksa. Metode ini dipengaruhi banyak faktor fisik dan kimiawi di samping interaksi antara obat dengan organisme, misalnya pembenihan dan daya difusi, ukuran molekul dan stabilitas obat. Kesulitan terbesar adalah laju pertumbuhan yang beragam diantara berbagai mikroorganisme (Lopez-Lazaro *et al.*, 2000).

Kesimpulan

Penelitian ini telah berhasil mengisolasi 13 bakteri *Escherichia coli* dari 40 sampel daging ayam yang diisolasi dari beberapa peternakan dan pengepul ayam di Surabaya. Sebanyak 13 sampel bakteri *Escherichia coli* resisten terhadap *ampicillin* 10 µg dengan ukuran zona hambat ≤ 12 mm.

Daftar Pustaka

- Alfiasari. 2012. Metode Penulisan dan Penyajian Ilmiah. Departemen ilmu Keluarga dan Konsumen, FEMA Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Anand K.B., Agrawal P., Kumar S., and Kapila K. 2009. Comparison Of Cefoxitin Disc Diffusion Test, Oxacillin Screen Agar, And PCR For *MecA* Gene For Detection Of MRSA. Indian Journal of Medical Microbiology, 27(1): 27-9.
- Barton, M.D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nutrition Research Reviews. 13 (2): 1-19.
- Chusniati, Sri., E.R.S Iman., R. Ratnasari., H.E. Naruni., Suryanie. W. Tyasningsih. 2011. Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner I. Airlangga University Press. Surabaya. Halaman 227

Clinical and Laboratory Standarts Institute, 2011.M100-S21 (M2).
Disk Diffusion Supplemental
Tabels, CLSI, Wayne Pa. USA.
Vol 31 No. 1.

Hadiwiyoto, S. 1994. Teori dan Prosedur
Pengujian Mutu Susu dan Hasil
Olahannya. Liberty. 2: 160-169.

Lopez-Lozaro, Monnet L., Yagüe D.,
Burgos A., Gonzalo A.,
Campillos N., and Saez M.
2000. Modelling and
forecasting antimicrobial
resistance and its dynamic
relationship to antimicrobial
use: a time series analysis.
**International Journal of
Antimicrobial Agents 14 (1):
21-31.**

Lukman dan S. Isroin. 1986. Pengantar
Sanitasi Makanan. Universitas
Padjajaran. Bandung.

Prawesthirini, S., H. P. Siswanto, A. T.
S. Estoepangestie, M. H.
Effendi, N. Harijani, G. C. de.
Vries, Budiarto, dan E. K.
Sabdoningrum,. 2009. Analisa
Kualitas Susu, Daging, dan
Telur. Fakultas Kedokteran
Hewan Universitas Airlangga.
Surabaya.

Tabbu, C. R. 2000. Penyakit Ayam dan
Penanggulangannya Vol. 1.
Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
Hal 31-40.