

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Escherichia coli* PENGHASIL *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase* DARI SWAB RECTAL SAPI PERAH MENGGUNAKAN METODE VITEK-2 DI KUD TANI WILIS SENDANG KABUPATEN TULUNGAGUNG**

**IDENTIFICATION OF *ESBL - E. coli* USING VITEK-2 METHOD ISOLATE FROM RECTAL SWAB OF DAIRY COWS IN TANI WILIS DAIRY COOPERATIVE, IN SENDANG- TULUNGAGUNG DISTRICT**

**Akyun Rozaqi Syah Putra <sup>1)</sup>, Mustofa Helmi Effendi <sup>2)</sup>, Setiawan Koesdarto <sup>2)</sup>, Suwarno <sup>2)</sup>, Wiwik Tyasningsih <sup>2)</sup>, Agnes Theresia Soelih Estoepangestie <sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>Mahasiswa, <sup>2)</sup>Dosen

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C UNAIR, Jl. Mulyorejo-Surabaya 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email: jbmvnair@gmail.com

**ABSTRACT**

Antibiotic resistance in animals and humans has become a global problem that needs attention. The use of antibiotics in inappropriate on food-producing animals can lead to resistance many of the pathogenic bacteria to the various types of antibiotics, one of which is the *Escherichia coli* (*E. coli*) which produces extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). The aim of this study was to isolate and identified ESBL- *E. coli* isolate from dairy cow rectal swabs in Sendang, Tulungagung district using the Vitek-2 method. The number of rectal swab samples used in the present study was 50. The result of the study showed that from all of the samples could be isolated and indentified *E. coli*, based on the colony characteristics on EMBA and biochemical test. Based on the double disc synergy test method using antibiotic disc amoxicylyn-clavulanate, ceftriaxone, aztreonam, ceftazidime and cefotaxime, 10 isolates could be identify els ESBL- *E. coli*. furthermore 3 out of 10 isolates DDST positives were confirmed ESBL- *E. coli* using Vitek-2 method.

**Key words:** *Escherichia coli*, ESBL, Antibiotic Resistance

**PENDAHULUAN**

Terjadinya resistensi antibiotik disebabkan penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak seksama dalam pengobatan. Bakteri dinyatakan resisten bila pertumbuhannya tidak dapat dihambat oleh antibiotika pada dosis maksimum. Resistensi antibiotik merupakan kensekuensi dari penggunaan antibiotik yang keliru dan perkembangan dari mikroorganisme tersebut, keadaan tersebut juga karena adanya mutasi atau resistensi gen yang didapat sehingga terjadi resistensi terhadap antibiotik. Resistensi antibiotik pada saat ini menjadi masalah kesehatan masyarakat dan telah dilaporkan oleh Badan Kesehatan Dunia bahwa

resistensi antibiotik menjadi ancaman bagi kesehatan umat manusia. Bakteri dalam menimbulkan resistensi terhadap antibiotik memiliki mekanisme yang berbeda salah satunya melalui transfer gen melalui plasmid. Gen yang mengontrol produksi  $\beta$  -lactamase terletak di dalam plasmid atau kromosom.

Salah satu enzim yang dibawa oleh plasmid adalah enzim betalaktamase. Bakteri yang menghasilkan enzim betalaktamase bisa disebut dengan bakteri *Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL). ESBL adalah enzim yang mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis antibiotika golongan cephalosporin

generasi satu, dua, dan tiga, serta golongan aztreonam tetapi tidak pada carbapenem dan dihambat oleh penghambat beta-lactamase seperti klavulanate, sulbactam dan tazobactam (Paterson *et al*, 2005). Resistensi yang dikarenakan oleh Bakteri ESBL sering dikaitkan dengan resistensi terhadap antibiotik golongan lain yang digunakan pada manusia (WHO, 2016).

Hewan penghasil pangan mampu menyebarkan bakteri yang bersifat resisten terhadap antibiotik melalui feses. Melalui feses, bakteri resisten yang terkandung dalam kotoran hewan dapat bermigrasi di sekitar peternakan, rumah potong hewan diantaranya pekerja yang telah terinfeksi oleh bakteri yang sudah resisten memiliki potensi yang tinggi dalam menyebarkan bakteri tersebut pada lingkungan atau orang di sekitarnya, air yang terdapat pada industri yang telah terkontaminasi oleh bakteri dan bisa melalui udara selama transportasi hewan.

Akibatnya menimbulkan keawatiran terhadap kesehatan manusia dan hewan. Satu pendekatan dilakukan untuk membatasi adanya resistensi antibiotic terutama yang melibatkan hewan yang kaitannya dekat dengan kehidupan manusia.

Terdapat *E. coli* penghasil ESBL yang ditemukan pada manusia, ternak, satwa liar dan isolate non klinis (Hordjik *et al*, 2013). Penelitian ini fokus pada identifikasi dan konfirmasi keberadaan *E. coli* pengasil ESBL melalui sifat resistensinya terhadap antibiotik jenis  $\beta$ -laktam dengan menggunakan metode vitek-2. Metode ini sangat unggul untuk mendeteksi enzim betalaktam. Metode vitek- 2 adalah sistem identifikasi otomatis untuk mikroorganisme untuk menunjukkan fenotipe dari isolat yang di uji dan mampu menentukan sensitifitas ataupun resistensi suatu isolat terhadap antibiotic (Sanders and Amanda, 2018).

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

### Cara Pengambilan Sampel

Sampel swab rectal diambil mulai November 2018 sampai maret 2019. Sampel diambil dari peternakan sapi perah di Kecamatan Sendang Kabupaten Tulungagung. Jumlah sampel yang diambil sebanyak 50 sampel swab rektal pada sapi perah. Hasil swab diberi label dan sampel harus dilakukan secara aseptis. Menggunakan stick swab steril lalu dimasukkan pada tabung eppendorff yang berisi media Buffer Pepton water 1 %. Setelah sampel diambil lalu sampel disimpan di ice box dan segera dibawa ke laboratorium untuk diperiksa (Safitri dkk, 2017)

### Isolasi dan Identifikasi *Escherichia coli*

Sampel swab rectal dalam media Buffer pepton water 1 % ditanam pada media *Briliant Green Bile Broth* (BGBB) (E. Merck, Darmstadt, Germany) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam (Effendi *et al*, 2018).

Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung gas pada tabung Durham dan perubahan warna hijau menjadi Hijau keruh. Setelah positif kemudian ditanam pada media *Eosin Methylen Blue* (EMBA) (E. Merck, Darmstadt, Germany) dengan cara streak dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni khas *E. coli* pada media EMBA berwarna hijau metalik. Koloni khas *E. coli* yang tumbuh di EMBA ditanam lagi di media *Buffer Pepton Water 1%* lalu inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Media *Pepton Water* yang sudah diinkubasi ditetesi dengan reagen Kovach sebanyak dua atau tiga tetes. Uji positif *E. coli* ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media *Buffer Pepton Water 1%*. Selanjutnya isolate yang positif

*E. coli* ditanam pada media *Eosin Methylen Blue* (EMBA) (E. Merck, Darmstadt, Germany) dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Effendi *et al*, 2019).

## KONFIRMASI ESBL

### Double Disk Synergy Test (DDST)

Uji konfirmasi *E. coli* ESBL yaitu dengan menggunakan metode Double Disk Synergy Test (DDST) menghasilkan kategori yang bersifat kualitatif dengan penilaian *sensitive*, *intermediate* dan *resistant* dengan menggunakan disk antibiotik (OXOID, Basingstoke, United Kingdom), Amoxicillin-clavulanate 30 µg (CT0223B), Ceftriaxone 30 µg (CT0003), Aztreonam 30 µg (CT0417), Cefotaxime 30 µg (CT0166), Ceftazidime 30 µg (CT0412).

Penanaman pada lempeng agar dilakukan dengan mengambil isolat *E. coli* di uji kekeruhannya dengan standart *Mc Farland* 0,5 kemudian diusapkan perlahan dengan swab steril pada seluruh permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA).

Interprestasi hasil dengan cara mengukur penghambatan diameter zona hambat yang terbentuk sesuai dengan Clinical dan Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016).

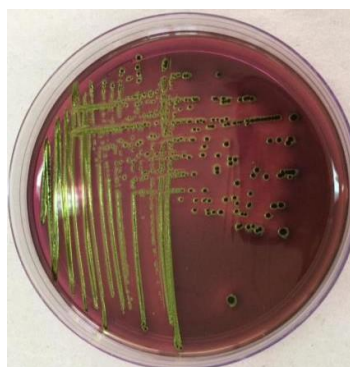
### Vitek-2 Compact

Semua isolate yang termasuk dalam kategori resisten di uji identifikasi dan konfirmasi fenotipe dengan menggunakan metode Vitek-2 Compact system dan dikerjakan sesuai protocol (BioMerieux, Marcy L'Eyoily, France) dan hasilnya secara otomatis keluar dalam bentuk pint out.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

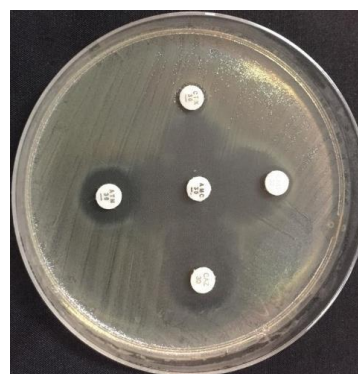
Hasil isolasi dan identifikasi pada 50 sampel swab rectal sapi perah yang diperoleh dari kabupaten Tulungagung

menunjukkan sebesar 50 sampel (100%) menunjukkan terjadinya perubahan warna hijau terang ke hijau keruh serta ada gas pada tabung durham pada media BGGB. Pada media EMBA sebanyak 50 sampel (100%) terjadi perubahan warna menjadi hijau metalik. Terdapat cincin merah pada media Buffer pepton water saat di tambah dengan reagen kovach pada media Buffer Pepton water sebanyak 50 sampel positif *Eschericia coli*. Isolat yang positif *E. coli* di dimurnikan dengan media eosin methylen blue agar (EMBA) yang Nampak hijau metalik terlihat pada gambar 1.



Gambar 1. Presumtive *E.coli* pada Media EMBA

Uji konfirmasi ESBL dari isolate *E. coli* menggunakan metode DDST dan Vitek-2. Pada metode DDST terdapat pembesaran zona dengan adanya pola sinergitas dari kelima antibiotik dengan amoxycylin- clavulanate sebagai inhibitornya (gambar 2)



Gambar 2. DDST Untuk Konfirmasi ESBL

**Table.1 Data of ESBL isolates in this study from Sendang Tulungagung Farms**

Lokasi	Nomor Sampel	Positive <i>E. coli</i>	ESBL Konfirmasi dengan DDST	ESBL Konfirmasi dengan Vitek-2
Tulungagung	50	50	3	3
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

Hasil identifikasi dari 50 sampel swab rectal ditemukan sebanyak 3 isolat *E. coli* positif ESBL, hal ini sangat perlu dapat perhatian khusus bahwa hewan yang dekat dengan manusia bisa menjadi reservoir utama persebaran resistensi antibiotik di lingkungan yang dapat menjadi masalah dalam kesehatan masyarakat karena penyebarannya dari hewan ke manusia yang bisa terjadi kapan pun (Santos *et al*, 2013). O'Brien, 2002 mengatakan bahwa *E. coli* berperan dalam penyebaran gen resisten terhadap populasi bakteri antara hewan dan manusia melalui foodborne. Screening bakteri penghasil ESBL biasanya sering dilakukan pada manusia saja serta pada lingkungan rumah sakit, tetapi akhir-akhir ini menunjukkan bahwa munculnya bakteri patogen yang resisten pada hewan ternak, hewan pendamping dan makanan hewan (Ghatak *et al*, 2013).

Keberadaan bakteri *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dalam sampel feses hewan ternak menimbulkan risiko terjadinya kontaminasi pada karkas pada saat pemotongan, sehingga berpotensi adanya kontaminasi pada produk daging (Geser *et al*, 2011). *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL, termasuk *E. coli* yang mengontaminasi produk asal hewan berpotensi menyebabkan risiko

kesehatan meskipun tingkat risikonya sulit untuk dikuantifikasi. Infeksi bakteri penghasil ESBL melalui konsumsi pangan asal hewan dapat menyebabkan terbatasnya pilihan dalam penanganan pasien. Keadaan tersebut dapat memperpanjang masa perawatan, meningkatkan biaya pengobatan, meningkatkan tingkat kejadian penyakit, dan kematian.

Laporan penelitian tentang kasus *E. coli* penghasil ESBL pada hewan telah banyak dilakukan di berbagai negara. Babypedmini dan Appalaraju menunjukkan bahwa *E. coli* penghasil ESBL sebanyak 41% dan *K. pneumoniae* sebesar 40%. Prevalensi *E. coli* penghasil ESBL yang ada di Malaysia 5.6 %, Jepang 8,1%, Filipina 13,3%, Taiwan 16,7% dan Indonesia 23% (Parasakhti *et al*, 2001). Prevalensi *E. coli* penghasil ESBL dari feses sapi potong yang ada di kota Bogor, Indonesia sebesar 15,8% (Sukmawinata, 2015). Selain itu, hasil penelitian di Paris yang dilakukan oleh Haenni *et al*. Tahun 2014 menunjukkan prevalensi *E. coli* penghasil ESBL sebesar 29.4% dari 491 feses pedet yang diisolasi dari 12 rumah potong hewan.

Schmid *et al* Tahun 2013 melaporkan tentang kejadian cemaran *E. coli* penghasil ESBL sebesar 32,8 % yang berasal dari sampel peternakan sapi perah dan sapi potong yang diambil mulai dari 2011-2012 di Bavaria,

Jerman. Pada penelitian yang lain yang dilakukan oleh Odenthal et al. Tahun 2016 mendapatkan hasil yang lebih tinggi sebesar 75,6 % tentang kejadian cemaran *E. coli* penghasil ESBL yang berasal dari peternakan sapi perah yang ada di Jerman. Penelitian yang dilakukan di Indonesia mengenai tingkat cemaran bakteri penghasil ESBL masih fokus terhadap cemaran yang terjadi pada manusia. Kejadian infeksi bakteri penghasil ESBL di rumah sakit di Surabaya dari tahun 2006-2012, yaitu 34,84% (Kuntaman dkk, 2006), 6,66% (Bramantono dkk, 2012), dan 94,5% (Severin et al, 2010).

Menurut CLSI Tahun 2014 menjelaskan bahwa alat Vitek-2 Compact system (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) merupakan suatu system untuk mengidentifikasi dan pengujian resistensi semiotomatis untuk bakteri sehingga memungkinkan dalam menentukan MIC secara cepat dengan menganalisa kinetika pertumbuhan bakteri dengan antimikroba dengan menggunakan suatu kartu untuk menguji. Metode Vitek-2 ini terbukti sangat baik dalam mendeteksi adanya resistensi bakteri terhadap suatu antibiotic karena hasilnya sangat akurat dan tidak ada yang subjective (Munoz et al, 2013).

Pada studi yang dilakukan Spanu et al. Tahun 2006 metode vitek- 2 memiliki sensitivitas sebanyak 98,1 % dan spesifitasnya 99,5 %. Metode vitek-2 compact sering digunakan sebagai acuan dalam mendeteksi *Enterobacteriaceae* penghasil ESBL dan metode ini dari beberapa referensi dan studi sangat dianjurkan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil ESBL dengan menggunakan metode ini.

## KESIMPULAN

Ditemukannya Bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBL dari peternakan sapi perah yang ada di sendang Kabupaten Tulungagung sebanyak 3 (6%) isolate

yang di uji konfirmasi dengan menggunakan DDST dan Vitek-2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa Bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBL dapat mengancam kesehatan hewan maupun manusia yang dapat menyebar secara cepat dan luas. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tingginya prevalensi *E. coli* ESBL di Sendang Kabupaten Tulungagung, Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Babypedmini S, Appalaraju B. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2004; 22(3):172-4.
- Bramantono, Purwati, Hamidah. The prevalence of extended spectrum betalactamase (ESBL) in third generation cephalosporin usage among sepsis patients in the department of internal medicine RSUD Dr. Soetomo Surabaya. *Folia Med Indones.* 2012; 49(4):244-251.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2014.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute (CSLI). Performances Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100S 26th. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016.
- Effendi MH, Harijani N, Budiarto, Triningtya NP, Tyasningsih W. and Plumeriastusi H. Prevalensi of Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Subclinical Mastitis in East Java Province, Indonesia. *Indian Vet. J.* 2019; 96(03): 22-25.

- Effendi MH, Harijani N, Yanestria SM, and Hastutiek P. Identification of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Raw Milk Samples from Dairy Cows in Surabaya, Indonesia. *Philipp. J. Ved. Med.* 2018; 55(SI): 109-114.
- Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cernela N, Haechler H. Fecal carriage of extended-spectrum β-laktamase-producing Enterobacteriaceae in swine and cattle at slaughter in Switzerland. *J Food Protect.* 2011; 74(3):446-449.
- Ghatak S, Singha A, Sen A, Guha C, Ahuja A, Bhattacharjee U, Das S, Pradhan NR, Puro K, Jana C., et al. Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase and extended spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from mastitic milk samples. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60(5): 385-9.
- Haenni M, Châtre P, Métayer V, Bour M, Signol E, Madec JY, Gay E. Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet Microbiol.* 2014; 171:321-327.
- Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, et al. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β-lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Front Microbiol* 2013; 4 : 274
- Kuntaman, Mertiasih NM, Hadi U. Multiresistance pattern of extended spectrum β-lactamase (ESBL)-*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Folia Med Indones.* 2006; 42(1):40-46.
- Munoz-Davila MJ, Roig M, Yague G, Blazquez A, Salvador C, Segovia M. Comparative evaluation of Vitek-2 identification and suceptibility testing of urinary tract pathogens directly and isolated from chromogenic media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32:773-780.
- O'Brien TF. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis.* 2002; 3:78-84.
- Odenthal S, Akinenden O and Usleber E. Extended-Spectrum β-Lactamase producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk from German diary Farm. *Internasional Journal of Food Micribiology* 238 2016; P:72-78.
- Parasakthi N, Arrifin H, Kamarulzaman A, Ibrahim HSM, Adnan A, Choeng I. Consensus guidelines for the management of infections by ESBLproducing bacteria. Kuala Lumpur (MY): Malaysian Society of Infectious Disease and Chemotherapy. 2001; P: 3.
- Paterson DL and Bonomo RA. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 657-86;

- Safitri RD, Cicilia R, Bintari IG, Hermawan IP, Effendi MH, Ernawati R. and Rahmahani J. Detection of Encoding Gene Extended Spectrum Beta Lactamase on *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chicken Meat in Traditional Market Surabaya. International Journal of Development Research 2017; 07(11): 17254-17357.
- Sanders and Amanda M. Vitek 2 Compact-Identification and Susceptibility Testing. Standard Operating Procedure 2018
- Santos LL, Moura RA, Agilar-Ramires P, Castro AP, Lincopan N. 2013. Current status of extended-spectrum  $\beta$ -laktamas (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in animals. FORMATEX. 3:1600-1607.
- Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. Appl Environment Microbiol. 2013; 79(9):3027-3032.
- Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanto M, Toom NL, Duerink DO, Hadi U, Belkum A, Verburg HA, Goessens WH. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Surabaya, Indonesia. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:465-469.
- Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, Santangelo R, Cauda R, Fadda G. Evaluation of the New VITEK-2 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Test for Rapid Detection of ESBL Production in Enterobacteriaceae Isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2006; p:3257-3262.
- Sukmawinata E. Tingkat kejadian *Escherichia coli* penghasil Extended spectrum  $\beta$ -lactamase di feses sapi di rumah potong hewan ruminansia kota Bogor [tesis]. 2015; Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine. WHO CIA list 5th rev. World Health Organization 2016; p; 41