

Gen Resisten Antibiotik Pada Salmonella Yang Diisolasi Dari Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Di Kabupaten Sidoarjo

Sheila Marty Yanestria*

Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Wijaya Kusuma Surabaya
Jl. Dukuh Kupang XXV N0.54 Surabaya
email : sheila.marty11.sm@gmail.com

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen Tet(A), gen StrA dan gen Bla(tem) pada Salmonella yang diisolasi dari ikan bandeng (*Chanos chanos*) di Kabupaten Sidoarjo. Ada 20 sampel yang diambil dan diinokulasikan pada media pengayaan dan diisolasi pada permukaan *Salmonella Shigella Agar*. Salmonella memiliki bentuk koloni transparan dengan warna kehitaman di tengah karena pembentukan gas H₂S. Sampel diidentifikasi sebagai Salmonella berdasarkan bentuk makroskopis dan morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan gram. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 9 dari 20 sampel adalah bakteri dari genus Salmonella dan 2 sampel memiliki gen invA. Selanjutnya, deteksi gen resisten menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction*. Elektroforesis hasil dari 2 sampel positif Salmonella patogen menunjukkan bahwa ada satu sampel positif gen tet(A), yang menghasilkan produk PCR dalam bentuk band dengan panjang 210 bp. Adanya gen resistensi antibiotik pada bakteri mengakibatkan pentingnya memantau kerentanan antimikroba dan mekanisme resistensi Salmonella yang diisolasi dari makanan, karena mekanisme baru dari resistensi yang terjadi pada hewan dapat memasuki rantai makanan dan ditransfer ke manusia. Kerjasama antar sektor sangat penting untuk memantau resistensi antimikroba di Indonesia.

Kata Kunci : Salmonella, Bandeng, Antibiotik, Resistensi, Polymerase Chain Reaction

Abstract

The purpose of this study was to identify the Tet(A) gene, StrA gene and Bla(tem) gene in Salmonella isolated from milkfish (Chanos chanos) in Sidoarjo Regency. There were 20 samples taken and prepared in enrichment media and isolated on surface of Salmonella Shigella agar. Salmonella produced transparent colonies with a blackish color in the center due to H₂S gas formation. Samples identified as Salmonella based on macroscopic features and morphology of colonies, microscopic examination with gram staining. The results of this study showed that 9 of 20 samples were bacteria of the genus Salmonella and 2 samples has invA genes. Furthermore, detection of resistance gene using Polymerase Chain Reaction technique. Electrophoresis results from 2 positive samples of Salmonella pathogen showed that there was one sample positive tet(A) gene, which produced PCR product in the form of band with length 210 bp. The presence of antibiotic resistance gene among bacteria makes it especially important to monitor antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance of Salmonella isolated from food, because new mechanisms of resistance occurring in animals may enter the food chain and be transferred to the human. This importance of cooperation between sectors in order to monitor antimicrobial resistance.

Keywords: Salmonella, Milkfish, Antibiotic, Resistance, Polymerase Chain Reaction

Pendahuluan

Ikan menyumbang 17% dari asupan protein hewani di dunia. Di negara-negara berkembang, meskipun konsumsi ikan rendah dalam berat, ikan menyumbang 180 kilokalori per kapita per hari, di beberapa negara dengan ketersediaan ikan yang tinggi. Ikan adalah sumber protein berkualitas tinggi yang sangat baik, mengandung asam amino esensial yang diperlukan untuk kesehatan manusia, namun permukaan kulit ikan, usus

dan insang dapat mengandung mikroba yang tinggi. Bahaya keamanan pangan dalam akuakultur dapat terjadi karena polusi lingkungan, penyakit ikan dan agen mikroba penyebab penyakit seperti Salmonellosis (Bibi et al., 2015)

Salmonellosis adalah *food borne disease* yang menjadi perhatian di negara maju dan berkembang. Ini merupakan salah satu masalah utama kesehatan masyarakat yang berdampak pada sosial-ekonomi. Penyebaran penyakit ini berasal dari hewan

serta distribusi hewan dan produk makanan asal hewan (Ferdous *et al.*, 2013). Salmonellosis adalah salah satu penyakit berbahaya yang disebabkan oleh serotipe bakteri dari genus *Salmonella*, yang habitatnya dalam saluran gastrointestinal (Stegniy *et al.*, 2014). Penyakit ini memiliki tiga bentuk; gastroenteritis, septikemia dan demam enteric. Sebagian besar kasus salmonellosis pada manusia karena ikan disebabkan dari mengonsumsi daging ikan mentah tanpa diproses, ikan tidak matang sempurna dan kontaminasi silang (Rene *et al.*, 2011).

Masalah serius lain dari kasus salmonellosis adalah pada pengobatan, karena adanya resistensi antibiotik di antara *Salmonella* patogen. Munculnya bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik juga telah menjadi masalah kesehatan masyarakat yang besar. Dalam beberapa tahun terakhir, antibiotik berkontribusi pada peningkatan prevalensi resistensi yang tinggi terhadap antibiotik yang umum digunakan pada manusia. Agen antibiotik saat ini digunakan karena alasan utama yaitu untuk mengobati infeksi pada manusia dan hewan. Selain itu, antibiotik juga digunakan pada pakan hewan sebagai *growth promotor*. Ketika penggunaan antibiotik dilakukan terus-menerus dalam pengobatan manusia dan hewan, maka ada peningkatan gen resisten baru yang dapat dibagi di antara populasi bakteri (Doosti *et al.*, 2016).

Informasi mengenai gen resisten antibiotik pada *Salmonella* sangat penting untuk diselidiki guna mengetahui apakah terapi antibiotik tertentu masih efektif jika diberikan pada penderita salmonellosis. Oleh karena itu, peneliti mendeteksi gen resisten antibiotik pada *Salmonella* yang diisolasi dari ikan bandeng yang diperoleh dari Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Kabupaten Sidoarjo.

Metodologi Penelitian

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan bandeng sebanyak 20 ekor diperoleh dari Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Kabupaten Sidoarjo. Ikan dimasukkan ke dalam plastik dan diberi label, kemudian dimasukkan ke dalam *ice box*. Ikan dipotong dengan pisau untuk diambil dagingnya. Gerus daging dalam mortar dengan stemper, kemudian ambil sebanyak 25 gram dan dimasukkan ke dalam 225 ml *buffered pepton water* 10% selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hal ini dilakukan untuk pengayaan bakteri pada media *enrichment*

Isolasi dan Identifikasi *Salmonella*

Isolasi bakteri dilakukan dengan cara mengambil suspensi dengan ose yang terlebih dahulu disterilkan menggunakan api Bunsen. Suspensi kemudian ditanamkan pada media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA) yang sudah diberi label sesuai sampel menggunakan metode *streak* untuk mendapatkan koloni terpisah yang kemudian di inkubasikan selama 18 – 48 jam dalam suhu 35 – 37 °C. Pertumbuhan *Salmonella* menghasilkan koloni transparan atau tanpa warna dengan warna kehitaman di tengah akibat terbentuk gas H₂S.

Selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Sediaan kuman diambil dari hasil positif dari media *Salmonella Shigella Agar* kemudian dibuat preparat pada gelas objek yang steril, dilakukan pewarnaan gram menggunakan *ammonium oksalat Kristal violet 1%*, lugol, Alkohol 96 %. Preparat bakteri yang telah diwarnai diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000 X menggunakan oil emersi. Bakteri genus *Salmonella* akan tampak berwarna merah karena termasuk dalam bakteri gram negatif dengan bentuk basil.

Uji Biokimia dilakukan dengan melakukan penanaman koloni pada media miring *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Reaksi positif *Salmonella* pada TSIA adalah bagian dasar berwarna kuning karena produksi asam, Bagian Slant berwarna merah yang menunjukkan bahwa bakteri *salmonella* hanya memfermentasi glukosa, sedangkan sukrosa dan laktosa tidak difermentasi, terbentuk gas dan H₂S (memproduksi warna kehitaman) pada bagian dasar.

Deteksi Gen *InvA*, *Tet(A)*, *StrA* dan *Bla(tem)*

Deteksi gen penyandi *Salmonella* dilakukan dengan menggunakan uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Langkah awal dari PCR adalah ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA diawali dengan mengambil 2 µl *DNAzol® Direct* dan masukkan ke dalam *micropipet*. Tambahkan ke dalamnya ±2 mg (±1/2 koloni bakteri), lalu diamkan selama 15 menit. Koloni bakteri yg digunakan disini adalah koloni pada media SSA. Larutan ini siap untuk digunakan sebagai *DNA template*. Reagen untuk amplifikasi PCR terdiri dari 2.5 µl *DNA template*, 5 unit GoTaq DNA polymerase, 1× GoTaq PCR *reaction buffer* (mengandung 1.5mM MgCl₂), 0.2mM PCR *nucleotide mix*, dan 0.6 µM DNA primers dengan volume akhir of 50 µl.

Gen *InvA* digunakan untuk mendeteksi bakteri genus *Salmonella*. Gen *InvA* mengkodekan protein dalam membran sel

bakteri yang diperlukan untuk invasi ke sel epitel inang. Gen Tet(A) mengkodekan resisten tetracyclin, gen StrA mengkodekan resisten Streptomycin dan gen Bla(tem) mengkodekan resisten betalactam.

Tabel 1. Primer InvA, Tet (A), StrA dan Bla (tem)

Gen	Primer	Produk PCR
InvA	Forward : GTGAAATTATCGCCACGTTTC GGCAA Reverse : TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284 bp
Tet(A)	Forward : GCTACATCCTGCTTGCCTTC Reverse : CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210 bp
StrA	Forward : ACCAATGCTTAATCAGTGAG Reverse : GCGGAACCCCTATTTG	548 bp
Bla(tem)	Forward : ACCAATGCTTAATCAGTGAG Reverse : GCGGAACCCCTATTTG	963 bp

Campuran reagen PCR tersebut kemudian dimasukkan dalam *thermocycler* dengan inkubasi awal 94°C selama 1 menit diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari 94°C untuk denaturasi selama 1 menit. Suhu annealing pada keempat gen secara berurutan sesuai tabel 1 yaitu 64°C, 58°C, 58°C, dan 50°C selama 30 detik dan elongasi 72°C selama 30 detik. Diikuti dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 7 menit. Masing-masing 3 µl produk amplifikasi dicampur dengan 3 µl larutan loading sampai tercampur dengan baik.

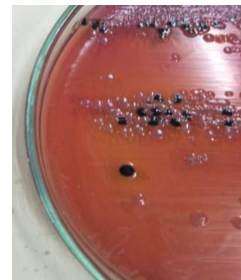
Hasil amplifikasi produk PCR dilakukan elektroforesis dalam 1,5 % gel agarosa. Dimasukkan juga *marker* ke dalam sumur gel agarosa untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 40 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV). Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda.

Hasil Dan Pembahasan

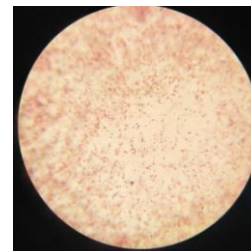
Isolasi dan Identifikasi Salmonella

Hasil pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis menunjukkan hasil 9 sampel positif dari 20 sampel (30%). Pada pemeriksaan secara mikroskopis menggunakan pewarnaan gram. Hasil positif pada media SSA berupa koloni tidak berwarna

dengan titik hitam di tengahnya, koloni ini kemudian ditanamkan pada media miring *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Reaksi positif *Salmonella* pada TSIA adalah bagian dasar berwarna kuning karena produksi asam, bagian permukaan berwarna kuning karena produksi asam yang berasal dari laktosa dan atau sukrosa, terbentuk gas di bagian dasar dan H₂S memproduksi warna kehitaman. Hasil positif pada pemeriksaan mikroskopis menunjukkan adanya bakteri berbentuk batang panjang maupun sedang, berwarna merah, bakteri gram negatif, menyebar sempurna tanpa membentuk rantai panjang ataupun bergerombol.



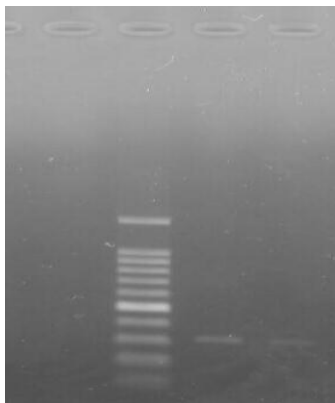
Gambar 1. Koloni Salmonella pada SSA



Gambar 2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Salmonella

Deteksi Gen InvA, Tet (A), StrA dan Bla (tem)

Sejumlah 9 sample yang positif *Salmonella* secara makroskopis dan mikroskopis diuji PCR dengan menggunakan primer InvA untuk mendeteksi Genus *Salmonella*. Hasil Uji PCR menggunakan primer InvA menunjukkan 2 sample positif terdapat gen InvA sepanjang 284 bp.



Gambar 3. Hasil Deteksi Gen InvA menggunakan PCR

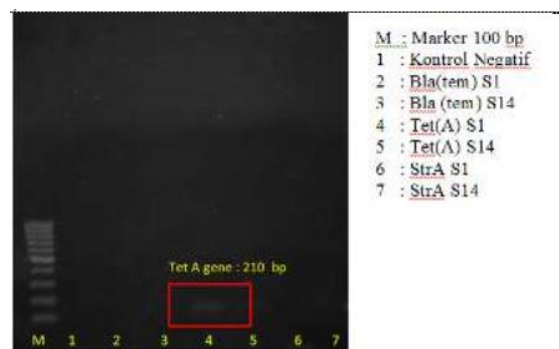
Teknik pemeriksaan PCR dengan primer inv A sangat cepat dilakukan, sensitif dan spesifik dalam mendeteksi Salmonella. Gen invA memang ditargetkan untuk diagnosis organisme Salmonella pada tingkat genus, dan kombinasi gen polimorfik, rfbJ (B), fliC dan fljB digunakan untuk mengidentifikasi Salmonella pada tingkat serotipe. Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pererat and Murray (2008) bahwa hasil PCR pada Salmonella berbagai serotipe menunjukkan hasil positif, sedangkan hasil PCR pada strain non salmonella seperti *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella* negatif terhadap gen invA.

Salah satu langkah awal dalam siklus patogenitas intraseluler Salmonella yaitu invasi sel epitel usus. Gen InvA mengkode protein pada membran sel bakteri yang diperlukan untuk invasi ke dalam sel epitel host (Sharma and Das, 2016). Gen ini terletak pada *pathogenicity island 1* atau disebut sebagai *Salmonella Pathogenicity Island* (SPI), region DNA tersebut berhubungan dengan patogenitas *Salmonella enterica* dan dimiliki oleh semua serotipenya (Murray and Lee, 2000). *Salmonella Pathogenicity Island* berfungsi dalam menambah virulensi yang kompleks oleh bakteri terhadap inang yang diinfeksi (Pererat and murray, 2008).

Berdasarkan hasil PCR, dari 9 sampel positif Salmonella hanya 2 sampel yang terdeteksi adanya gen invA sebesar 284 bp, sedangkan 7 sampel lagi tidak menunjukkan band target. Hal ini menunjukkan bahwa gen invA tidak ada pada 7 strain bakteri tersebut dan muncul dugaan bahwa strain bakteri yang didapat tidak invasif, atau mungkin juga menggunakan mekanisme invasif lainnya (Malorny *et al.*, 2003).

Kedua isolat Salmonella yang positif InvA diperiksa gen resisten antibiotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua sampel negatif gen StrA dan gen Bla(tem), tetapi satu

sampel positif Tet(A) dan menunjukkan band target sepanjang 210 bp (Tet A S1 pada Gambar 4).



Gambar 4. Hasil PCR gen Bla(tem), Tet(A) dan StrA

Tetrasiklin secara klinis dikenal sebagai antibiotik spektrum luas dan efektif terhadap banyak bakteri gram positif dan negatif. Tetrasiklin sebagian besar bertindak dengan menghentikan pengikatan tRNA ke site A dari subunit ribosom 30S dengan menghambat sintesis protein. Namun, peningkatan bakteri resisten antibiotik telah sangat membatasi penggunaan tetrasiklin. Banyak temuan menunjukkan bahwa resistensi tetrasiklin pada Salmonella dapat dikaitkan dengan produksi pompa penghabisan energi untuk menghilangkan antibiotik dari dalam sel, modifikasi target ribosom, inaktivasi enzimatis tetrasiklin dan mekanisme resistensi lainnya (Abatcha *et al.*, 2014).

Bakteri mendapatkan resistensi terhadap tetrasiklin, mulai dari efflux, modifikasi obat, mutasi target dan penggunaan protein proteksi ribosom. Antibiotik berinteraksi dengan pusat fungsional ribosom. Tetrasiklin, yang berikatan dengan pusat dekode subunit kecil dimana kodon mRNA dikenali oleh antikodon tRNA. Selain itu, ada mekanisme karena beberapa bakteri secara alami lebih tahan terhadap tetrasiklin karena perbedaan permeabilitas membran sel. Misalnya, bakteri Gram-negatif secara alami resisten terhadap beberapa antibiotik karena adanya lipopolisakarida yang mengandung lapisan membran luar (Nguyen *et al.*, 2014).

Penyebaran resistensi terhadap beberapa antibiotik sangat mengkhawatirkan. Globalisasi perdagangan, yang tergantung pada pergerakan barang, hewan, dan produk makanan, berarti bakteri resisten dapat didistribusikan secara luas dan ditransfer ke konsumen di seluruh dunia. Rute lain dari transfer resistensi adalah dari lingkungan yang terkontaminasi oleh pembuangan antibiotik tingkat tinggi dan bakteri yang resisten

antibiotik. Resistensi antibiotik pada *Salmonella* telah menyebabkan rawat inap yang lebih sering, penyakit yang lebih rumit dan berkepanjangan, kegagalan pengobatan, risiko penyakit invasif yang lebih tinggi dan peningkatan risiko kematian dua kali lipat dalam dua tahun setelah infeksi. Meningkatnya masalah resistensi antibiotik telah mengakibatkan penurunan kemanjuran antibiotik dan situasi yang mirip dengan era pra-antibiotik dalam beberapa kasus (Maka dan Popowska, 2016).

Kesimpulan Dan Saran

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat satu sampel positif gen Tet(A) dan tidak ada sampel positif gen StrA dan Bla(tem). Produk PCR yang menunjukkan gen resistensi tetrasiklin memiliki panjang 210 bp.

Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih banyak. Penelitian selanjutnya dapat menggunakan sampel dari bahan pangan asal hewan yang lain misalnya susu, daging dan telur.

Daftar Pustaka

- Abatcha, M. G, Z. Zakaria, D. G .Kaur and KL Thong. 2014. *A Trends of Salmonella and Antibiotic Resistance*. Adv. Sci. Technol Vol 17.
- Bibi, F., S. N. Qaisrani, A. N. Ahmad, M. Akhtar, B. N. Khan and Z. Ali. 2015. *Occurance of Salmonella in Freshwater Fishes*. J. Anim. Plant Sci, 25: 303 – 7081
- Doosti, A., E. Mahmoudi, M. Jami and A. Mokhtari-Farsani. 2016. *Prevalence of aadA1, aadA2, aadB, strA and strB Genes and Their Associations with Multidrug Resistance Phenotype in Salmonella Typhimurium Isolated from Poultry Carcasses*. The Thai Jornal of Veterinary Medicine, 46(4): 691 – 697.
- Ferdous, T,A., S. M. L Kabir , M. M. Amin and K. M. M. Hossain. 2013. *Identification and Antimicrobial Susceptibility of Salmonella Species Isolated from Washing and Rinsed Water of Broilers in Pluck Shops*. International Journal of Animal and Veterinary Advances, 5(1) : 1 -8.
- Maka, L. and M. Popowska. *Antimicrobial Resistance of Salmonella spp Isolated from Food*. 2016. Rock Panstw Zakl Hig, 67(4): 343 – 58.
- Malorny, B., C. Bunge and R. Helmuth. 2003. *Evaluation of Salmonella spp. Specific Primer-Sets for the Validation Within the Food PCR Project*. Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, National.
- Murray, R.A. and C. A. Lee. 2000. *Invasion Genes are Not Required for Salmonella enterica Serovar Typhimurium to Breach The Intestinal Epithelium: Evidence that Salmonella Pathogenicity Island 1 Has Alternative Functions during Infections*. Journal Infection and immunity vol 68 (9): 5050 -5055.
- Nguyen, F., A. L. Starosta, S. Arenz, D. Sohmen, A. Donhofer and D. N. Wilson. 2014. *Tetracyclin Antibiotics and Resistance Mechanisms*. Biological chemistry, 395(5): 559 – 575.
- Pererat, K. and A. Murray. 2008. *Development of a PCR Assay for The Identification of Salmonella Enterica Serovar Brandenburg*.
- Rene, S. H., A. R. Vieira, S. Karlsmose, M. A. Danilo, L. F. Wong, A. B. Jensen, H. C. Wegener and F.M. Aarestrup. 2011. *Global Monitoring of Salmonella Serovar Distribution from The World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: of Quality Assured Laboratories From 2001 To 2007*. Foodborne Pathogen and Disease: Vol. 8, No. 8.
- Sharma, I. and K. Das. 2016. *Detection of invA Gene in Isolated Salmonella from Marketed Poultry*. Journal of Food Process and Technology, 7: 3.
- Stegniy, B., A. Gerilovych, V. Arefyev, K. Glebova and A. Potkonjak. 2014. *A Method for Detecting and Typing of Salmonella by Multiplex PCR*. Arhiv Veterinarske Medicine, 7(2): 47 – 56.