

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**PENANGGULANGAN *ANTIBIOTICS RESISTANT* BERSUMBER
PANGAN ASAL HEWAN (PAH) MELALUI DETEKSI DINI DENGAN
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Nenny Harijani, drh., MSi.	00-0206-5804
Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH.	00-1501-6209
Budiarto, drh., MP.	00-2807-6103

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)

KCC
KK
LP 55/19
Har
P



**PENANGGULANGAN *ANTIBIOTICS RESISTANT* BERSUMBER
PANGAN ASAL HEWAN (PAH) MELALUI DETEKSI DINI DENGAN
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Nenny Harijani, drh., MSi.	00-0206-5804
Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH.	00-1501-6209
Budiarto, drh., MP.	00-2807-6103

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Penanggulangan Antibiotics Resistant Bersumber Pangan Asal Hewan (PAH) Melalui Deteksi Dini Dengan Polymerase Chain Reaction

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr NENNY HARIJANI, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0002065804
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Agribisnis Veteriner
Nomor HP : 0818526747
Alamat surel (e-mail) : nennyharjani@yahoo.co.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr MUSTOFA HELMI EFFENDI
NIDN : 0015016209
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : BUDIARTO M.P
NIDN : 0028076103
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 192,032,000

Mengetahui,
Dekan FKH UNAIR



(Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., Mkes.)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 15 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr NENNY HARIJANI, M.Si)
NIP/NIK 195806021988032001

Menyetujui,
Ketua LPI UNAIR





(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001



DAFTAR ISI

1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	2
3. METODE PENELITIAN	3
4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	4
5. PENUTUP	5
DAFTAR PUSTAKA	6
LAMPIRAN	7

NENNY HARIJANI
 NPM. 1520021001001

NENNY HARIJANI
 NPM. 1520021001001

RINGKASAN PENELITIAN

Sebagai suatu bahan pangan asal hewan yang bersifat organik, susu dapat dijadikan sarana yang potensial bagi pertumbuhan dan penyebaran bakteri. Susu memiliki kandungan gizi dan pH yang dapat dijadikan media pertumbuhan bagi bakteri, sehingga bakteri yang mengkontaminasi susu dan daging dapat tetap hidup dan berkembang biak di dalam susu maupun daging. Susu dan daging yang terkontaminasi oleh bakteri akan mengalami perubahan secara fisik baik dari segi warna, bau, rasa dan konsistensinya serta perubahan kimia yang ditandai dengan perubahan nilai pHnya.

Escherichia coli yang sering kali mengkontaminasi bahan pangan asal hewan (PAH) dalam hal ini susu segar, dimana PAH tersebut sebagai sumber nutrisi utama untuk dikonsumsi oleh manusia memerlukan pengawasan yang intensif agar tetap dalam kondisi higienis dan tidak berdampak negatif bagi kesehatan manusia. *Escherichia coli* dikategorikan sebagai bakteri yang berbahaya terhadap manusia maupun hewan karena dapat menjadi patogen, jika jumlah bakteri tersebut dalam meningkat didalam saluran pencernaan. Bakteri *Escherichia coli* mempunyai kemampuan untuk menimbulkan penyakit bila terjadi adanya perubahan keadaan di dalam tubuh inang atau adanya kesempatan untuk memasuki bagian tubuh yang lain dari inang.

Terjadinya infeksi dari *Escherichia coli* dilakukan suatu tindakan pengobatan dengan menggunakan antibiotik. Secara umum penggunaan antibiotika perlu dilakukan pemilihan berdasarkan dari beberapa aspek yaitu mekanisme kerja antibiotik terhadap bakteri, sifat bakteri yang peka terhadap antibiotik dan kemampuan antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri. Namun dengan banyaknya jenis, klasifikasi, pola kepekaan bakteri terhadap antibiotik dan penemuan antibiotik baru, keadaan inilah yang sering menyulitkan dalam penentuan secara klinis pemilihan antibiotik yang tepat ketika menangani suatu kasus penyakit. Hal ini dapat menjadi salah satu faktor yang memungkinkan pengobatan menggunakan antibiotik tidak tepat sasaran, sehingga memicu terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Selain itu resisten bakteri tersebut dapat ditransfer secara genetik.

Penelitian ini dilakukan menggunakan beberapa antibiotik, yang akan diuji sensitifitasnya untuk mengetahui tingkat kepekaan *Escherichia coli* terhadap antibiotik. Resistensi *Escherichia coli* terhadap beberapa antibiotik akan diteliti dengan pendekatan biologi molekuler untuk mendeteksi keberadaan gen penyandinya. Keberhasilan membuktikan adanya gen penyandi antibiotik pada *Escherichia coli* merupakan langkah strategis sebagai model untuk memutus *Antibiotics Resistant* yang terjadi pada masyarakat.

Kata kunci : *Antibiotics Resistant*, PAH, identifikasi molekuler, zoonosis, *Escherichia coli*



SUMMARY OF THE RESEARCH

As an organic animal food, milk can be used as a potential tool for the growth and spread of bacteria. Milk has a nutrient and pH content that can be used as a growth medium for bacteria, so bacteria that contaminate milk and meat can stay alive and multiply in milk and meat. Milk and meat contaminated by bacteria will experience physical changes both in terms of color, smell, taste and consistency as well as chemical changes characterized by changes in pH value.

Escherichia coli which often contaminates food from animal origin in this case fresh milk, where the foods as the main source of nutrients for consumption by humans requires intensive supervision to remain in hygienic conditions and not have a negative impact on human health. *Escherichia coli* is categorized as a bacterium that is harmful to humans and animals because it can become a pathogen, if the amount of bacteria in it increases in the digestive tract. *Escherichia coli* bacteria have the ability to cause disease if there is a change in the condition of the host's body or an opportunity to enter other parts of the body from the host.

The occurrence of an infection from *Escherichia coli* is carried out by an antibiotic treatment. In general, antibiotic use needs to be selected based on several aspects, namely the mechanism of action of antibiotics against bacteria, the nature of bacteria that are sensitive to antibiotics and the ability of antibiotics to grow bacteria. But with many types, classifications, patterns of bacterial sensitivity to antibiotics and the discovery of new antibiotics, these conditions often make it difficult to determine clinically the correct choice of antibiotics when handling a case of disease. This can be one of the factors that allows treatment using antibiotics not on target, which triggers bacterial resistance to antibiotics. In addition, the resistant bacteria can be genetically transferred.

This study was conducted using several antibiotics, which will be tested for sensitivity to determine the sensitivity level of *Escherichia coli* to antibiotics. *Escherichia coli* resistance to several antibiotics will be investigated with a molecular biology approach to detect the presence of gene encoding. The success of proving the existence of antibiotic encoding genes in *Escherichia coli* is a strategic step as a model to break Antibiotics Resistant that occurs in the community.

Keywords: Antibiotics Resistant, molecular identification, zoonosis, *Escherichia coli*

KATA PENGANTAR

Atas hidayah dari Allah Yang Maha Esa, penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan hasil penelitian ini dengan lancar. Dengan harapan, semoga tulisan ini dapat meningkatkan pengetahuan kita di bidang zoonosis tentang sumber infeksi yang berasal dari pangan asal hewan seperti susu segar atau daging. Penelitian yang berjudul “**PENANGGULANGAN *ANTIBIOTICS RESISTANT* BERSUMBER PANGAN ASAL HEWAN (PAH) MELALUI DETEKSI DINI DENGAN *POLYMERASE CHAIN REACTION*” dilakukan dengan tujuan meningkatkan pengetahuan tentang faktor virulensi dan aspek *antibiotics resistant* dari *Escherichia coli*. Sehingga dapat diketahui gen penyandi ekspresi protein yang bertanggung jawab terhadap patogenesis infeksi yang diakibatkan adanya *antibiotics resistant* pada manusia.**

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian Nomer: 200/UN3.14/LT/2018, Tanggal 10 Maret 2018. Laporan akhir penelitian ini tidak akan selesai dengan baik tanpa bantuan dan bimbingan berbagai pihak, untuk itu penulis mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Moh. Nasih, SE Ak.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., Mkes.
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Prof. Drs. Hery Purnobasuki, Ph D.
4. Para staf Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner. yang selalu berusaha meluangkan waktunya untuk diskusi kepada penulis.

Akhir kata, dengan segala kerendahan hati semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmatnya kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan akhir penelitian ini. Laporan akhir penelitian ini masih belum sempurna, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun, dan semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan bagi pembaca pada umumnya.

Surabaya, 10 November 2018

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Rumusan Masalah	3
BAB 2. URAIAN KEGIATAN	4
2.1. Kualitas Susu	4
2.2. Tinjauan Sanitasi Susu	7
2.3. Penanganan Susu Hasil Pemerahan.....	9
2.4. Tinjauan <i>Escherichia coli</i>	9
2.5. Penggunaan Antibiotika di Bidang Peternakan	10
2.6. Pengujian Resistensi Terhadap Antibiotika.....	14
BAB 3 METODE PENELITIAN	18
3.1. Jenis Penelitian	18
3.2. Bahan Penelitian	18
3.3. Alat penelitian	18
3.4. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	18
3.5. Uji Sensitifitas Antibiotika	20
3.6. Kultur Bakteri.....	21
3.7. Ekstraksi DNA.....	21
3.8. Amplifikasi dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i>	21
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	24
5.1. Hasil Koleksi Sampel <i>i</i>	24
5.2. Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik.....	26
5.3. Elektroforesis Produk <i>Polymerase Chain Reaction</i>	29
5.4. Pembahasan	30
BAB 6.. INDIKATOR CAPAIAN TAHUNAN.....	32
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	33
7.1 Kesimpulan	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN-LAMPIRAN	37

MILIF
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Batas Maksimum Cemaran Mikroba (BMCM) pada susu segar menurut SNI 7388:2009	4
Tabel 4.1. Primer yang digunakan dalam penelitian .	22
Tabel 5.1. Hasil Uji Identifikasi <i>Escherichia coli</i>	24
Tabel 5.2. Daftar Peternakan Tempat Pengambilan Sampel Susu yang positif <i>Escherichia coli</i> di Surabaya	25
Tabel 5. 3. Hasil Uji Sensitifitas <i>Eschericia coli</i> Terhadap Antibiotik	27
Tabel 5. 4. Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik E. coli dari peternakan Surabaya	28

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1. Kandang Salah Satu Peternakan Sapi Perah di Batu	24
Gambar 5.2 Media EMBA yang ditumbuhi <i>Eshcerichia coli</i> .	25
Gambar 5. 3. Media BGGB berwarna hijau keruh dan menghasilkan gas.	26
Gambar 5. 4. Zona inhibisi (bening) uji sensitifitas <i>Eschericia coli</i> terhadap antibiotik pada media MHA)	27
Gambar 5.5. Hasil Elektroforesis 2% produk PCR, gen <i>shv</i> ditunjukkan dengan adanya <i>band</i> pada 768 bp	29
Gambar 5.6. Hasil Elektroforesis 2% produk PCR, gen <i>catA1</i> tidak ditunjukkan adanya band yang seharusnya ditunjukkan band pada 547 bp	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran.1. The INDIAN VETERINARY JOURNAL.....	37

BAB 1. PENDAHULUAN

Susu merupakan suatu bahan organik dapat dijadikan sarana yang potensial untuk pertumbuhan dan penyebaran bakteri. Adanya pertambahan jumlah bakteri di dalam susu, mengindikasikan bahwa susu tersebut tidak layak dan tidak aman untuk dikonsumsi (Yusuf, 2011). Hal tersebut disampaikan oleh sejumlah peneliti yang melaporkan bahwa bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang sering mengkontaminasi susu. Penyebab kontaminasi bakteri dapat berasal dari feces sapi dengan tingkat kontaminasi dari 10^8 cfu/gram hingga 10^9 cfu/gram (Bettelheim, 1997).

Manusia maupun hewan yang terinfeksi oleh bakteri *Escherichia coli* dilakukan pengobatan dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotika telah menjadi suatu langkah pilihan dalam kasus infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang lazim dikenal dengan istilah *drug of choice* (Meirawan, 2012). Istilah tersebut dalam penggunaan antibiotika dilakukan pemilihan berdasarkan dari beberapa aspek yaitu mekanisme kerja antibiotik terhadap bakteri, sifat bakteri yang peka terhadap antibiotik dan kemampuan antibiotik terhadap pertumbuhan-bakteri. Sehingga antibiotik tersebut akan menjadi pilihan yang tepat dalam kasus infeksi dibanding dengan obat antibiotik lainnya untuk tujuan yang sama (Mutschler, 1991).

Pemakaian antibiotik pada manusia dan hewan dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan efek samping berupa resistensi, maka perlu dilakukan pemilihan antibiotik secara selektif terhadap kasus infeksi oleh bakteri *Escherichia coli*, bertujuan agar antibiotik yang terpilih dapat bekerja secara efektif dengan toksisitas yang sangat minimal. Namun penggunaan antibiotik secara luas dalam ilmu kedokteran hewan akan menimbulkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik (Pyatov *et al.*, 2014). Banyaknya jenis, klasifikasi, pola kepekaan bakteri dan penemuan antibiotika baru sering kali menyulitkan penentuan secara klinis untuk menentukan pemilihan antibiotika yang tepat ketika menangani suatu kasus penyakit. Hal ini juga merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya resistensi (Utami, 2012).

Pada umumnya antibiotik yang digunakan untuk mengatasi infeksi ditinjau dari struktur kimianya terdapat dua golongan, antibiotik beta laktam dan antibiotik non beta laktam. Antibiotik beta laktam adalah golongan antibiotik yang memiliki kesamaan pada komponen strukturnya (adanya cincin beta laktam). Antibiotik non beta laktam adalah golongan antibiotik yang tidak memiliki cincin beta laktam. Antibiotik non beta laktam diklasifikasikan menjadi beberapa golongan, yaitu golongan aminoglikosida, quinolon, sulfonamida, makrolida dan tetrasiklin (Pieshesa, 2011). Resistensi bakteri *Escherichia coli* terhadap antibiotik aminoglikosida, sulfonamida dan tetrasiklin telah dibuktikan (Pyatov *et al.*, 2014).

Bakteri mampu mengembangkan resistensi terhadap obat-obatan melalui berbagai mekanisme yaitu mampu menghasilkan enzim yang dapat merusak obat aktif, mengubah permeabilitasnya terhadap obat tersebut, mengembangkan sasaran struktur yang berbeda dari target sasaran semula, mengembangkan jalur pintas metabolisme yang tidak dapat dihambat oleh obat, dan membentuk suatu enzim yang telah mengalami perubahan tetapi enzim tersebut masih dapat menjalankan fungsi metabolismenya namun tidak dipengaruhi oleh obat seperti enzim pada bakteri yang peka (Jawetz *et al.*, 1995).

Putra (2012), menyatakan bahwa resistensi dapat disebabkan oleh suatu faktor yang sudah ada pada bakteri tersebut. Bakteri *Escherichia coli* mempunyai gen yang berfungsi untuk melindungi dirinya dari pengaruh antibiotik yang berasal dari plasmid. Plasmid membawa beberapa gen resistensi obat yang sering terdeteksi pada *Escherichia coli* (Costa *et al.*, 2010). Plasmid tersebut dapat mentransfer gen resistensi pada bakteri yang sensitif terhadap antibiotik. Oleh karena itu, penilaian dan pengawasan dari resistensi pada tingkat genetik sangat penting (Pyatov *et al.*, 2014).

Berdasarkan latar belakang di atas disebutkan bahwa *Escherichia coli* adalah bakteri yang sering mengkontaminasi susu dan dapat menyebabkan infeksi baik pada manusia maupun hewan. Infeksi dari bakteri tersebut dilakukan suatu tindakan pengobatan dengan menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik menjadi masalah yaitu adanya resistensi bakteri terhadap antibiotik

yang dapat terjadi secara transfer genetik. Oleh karena itu, peneliti melakukan penelitian mengenai pembuktian gen penyandi resisten antibiotik *Escherichia coli* yang diisolasi dari susu segar dari Jawa Timur.

Rumusan Masalah

Bedasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- 1) Apakah ditemukan resistensi isolat *Escherichia coli* terhadap beberapa antibiotik yang diisolasi dari susu segar di Jawa Timur?
- 2) Apakah terbukti ditemukan fragmen gen penyandi resistensi antibiotik pada *Escherichia coli* yang diisolasi dari susu segar di Jawa Timur?

BAB 2. URAIAN KEGIATAN

2. STUDI PUSTAKA

2.1. Kualitas Susu

Kualitas susu sangat penting untuk diperhatikan dalam rangka penyediaan susu sehat untuk konsumen dan hasil olahannya. Diperlukan suatu peraturan yang mengatur batas maksimum cemaran mikroba untuk menjamin konsumen mendapatkan susu berkualitas baik (Marlina dkk., 2007). Sekarang di Indonesia peraturan tersebut mengacu kepada SNI 7388:2009 yang mengatur persyaratan jumlah total bakteri yang boleh ada dalam susu segar adalah 1×10^6 koloni/ml (Tabel 2.1). Disamping itu, ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi berkenaan dengan pencemaran beberapa jenis bakteri patogen.

Tabel 2.1. Batas Maksimum Cemaran Mikroba (BMCM) pada susu segar menurut SNI 7388:2009

No.	Jenis Cemaran Mikroba	BMCM
1.	TPC (30°C, 72 jam)	1×10^6 koloni/ml
2.	Koliform	2×10^1 koloni/ml
3.	MPN <i>Escherichia coli</i>	< 3/ml
4.	<i>Salmonella sp.</i>	negatif/25ml
5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^2 koloni/ml

Sumber : BSN (2009)

Keterangan :

TPC : *Total Plate Count*

MPN : *Most Probable Number*

Faktor-faktor yang harus diperhatikan untuk memperoleh susu yang berkualitas baik antara lain (Hadiwiyoto, 1994) :

a. Sapi Perah

Sapi perah yang dapat dimanfaatkan susunya untuk konsumsi manusia sebaiknya memenuhi persyaratan yang diatur dalam Surat Keputusan Menteri Pertanian No. 69/Kpts/TN.120/1/1995 yaitu sapi perah tidak menderita atau diduga menderita : (1) penyakit zoonosis antara lain salmonellosis, tubercullosis, dan brucellosis, (2) penyakit mulut dan kuku, (3) mastitis, (4)

endometritis yang disertai cairan berulang-ulang, (5) enteritis disertai diare hebat, (6) luka-luka pada ambing disertai nanah/cairan. Sapi juga tidak boleh sedang dalam pengobatan antibiotika, hormon, dan farmasetik lainnya sampai selesai waktu henti obat dari obat tersebut yaitu waktu yang dihitung sejak saat pengobatan terakhir sampai saat hasil produksi ternak dapat dipergunakan untuk konsumsi (Deptan RI, 1995).

b. Kesehatan dan Kebersihan Hewan

Usaha pertama yang paling penting adalah merawat kesehatan dan kebersihan sapi perah. Sapi yang tidak sehat dan tidak bersih pada waktu diperah akan menghasilkan susu yang mempunyai kandungan bakteri dalam jumlah banyak, terutama kesehatan dan kebersihan ambing harus benar-benar diperhatikan. Biasanya ambing yang tidak sehat menyebabkan susu banyak mengandung *Streptococcus* dan *Corynebacterium*. Ambing yang kotor menyebabkan susu banyak mengandung bakteri *Escherichia coli*. Setiap hari sapi perah dimandikan dan dicuci sampai bebas dari kotoran hewan dan sisa pakan yang menempel pada tubuhnya. Keadaan tubuh sapi harus bersih setiap kali akan diperah susunya (Hadiwiyoto, 1994).

c. Kesehatan dan Kebersihan Kandang

Jumlah bakteri dalam susu dapat naik dengan cepat jika kandang hewan tidak bersih dan tidak sehat. Kandang yang kotor dapat menyebabkan banyak kontaminasi, baik bakteri maupun benda lain seperti debu, pasir, bulu, dll (Hadiwiyoto, 1994). Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No. 69/Kpts/TN.120/1/1995, syarat kandang untuk usaha peternakan sapi perah antara lain: (1) bersifat permanen dan atau semi permanen, berlantai beton atau kayu yang tidak licin, lantai miring ke arah saluran pembuangan, dan mudah dibersihkan, (2) lantai kandang mempunyai ukuran sekurang-kurangnya $2 \times 1,5 \text{ m}^2$ untuk setiap ekor sapi dewasa, tidak termasuk jalur jalan dan selokan, (3) ventilasi dan pertukaran udara di dalam kandang menjamin bahwa udara segar dapat masuk leluasa ke dalam kandang dan sebaliknya udara kotor harus dapat keluar dari kandang, (4)

jumlah ternak yang dipelihara harus disesuaikan dengan luas lantai kandang yang ada, (5) limbah atau air buangan dari kandang harus ditampung pada tempat khusus (Deptan, 1995).

d. Kebersihan Alat-Alat Pemerah

Kontaminasi sering disebabkan karena peralatan pada waktu pemerahan, wadah susu, dan air pencuci alat yang kotor atau tidak terjaga kebersihannya. Pekerjaan sanitasi terhadap alat-alat dan wadah dapat dikerjakan dengan membersihkannya menggunakan air panas dengan suhu minimal 75°C dalam waktu paling sedikit 5 menit (Hadiwiyoto, 1994). Sanitasi alat dan wadah juga dapat dilakukan dengan bahan-bahan kimia, misalnya caustic soda (NaOH) sebanyak $\pm 1/3$ kilogram yang dilarutkan dalam 1 galon (± 4 liter) air. Kemudian dari larutan induk ini dibuat larutan 10% untuk membersihkan alat-alat tersebut (Rachmawan, 2001).

e. Kesehatan dan Kebersihan Pemerah

Pemerah merupakan orang yang pekerjaannya berhubungan langsung dengan pemeliharaan ternak perah dan produksi susu sehingga seorang pemerah harus berbadan sehat, berpakaian bersih, diperiksa kesehatannya secara berkala oleh Dinas Kesehatan Setempat, tidak berbuat hal-hal yang dapat mencemari susu, tidak mempunyai luka terbuka, dan tidak menderita penyakit kulit atau penyakit menular lainnya. Status kesehatan pemerah harus dinyatakan dengan Surat Keterangan Dokter yang diperbaharui setiap tahun (Deptan RI, 1995).

f. Penyimpanan dan Pengangkutan

Susu segar mempunyai suhu penyimpanan terbaik pada 3-4°C. Suhu penyimpanan di bawah 1°C dapat mengakibatkan emulsi susu pecah sehingga lemaknya terpisah atau terjadi denaturasi susu yang menyebabkan penggumpalan (Hadiwiyoto, 1994).

Pengangkutan susu harus dilakukan dalam kendaraan pengangkut susu berinsulasi untuk mempertahankan susu tetap 3-4°C sampai di tempat tujuan. Jika susu dalam *milk can*, maka harus diangkut dalam keadaan tertutup dan tidak boleh lebih dari 2 jam (Deptan RI, 1995).

2.2. Tinjauan Sanitasi Susu

Sanitasi adalah semua upaya yang dilakukan dalam rangka memelihara dan meningkatkan derajat kesehatan dan keamanan, melalui kegiatan kebersihan dan faktor-faktor lingkungan yang dapat menimbulkan gangguan penyakit (Depkes RI, 1998). Sanitasi susu adalah usaha kesehatan masyarakat untuk memelihara mutu susu di dalam setiap tahap pengolahan susu untuk tidak merugikan masyarakat (Kusnoputranto, 1996).

Pokok terpenting dari sanitasi susu yaitu susu harus aman untuk kesehatan masyarakat dan susu harus bersih. Aspek yang juga sangat penting dari sanitasi susu adalah pencegahan infeksi melalui susu. Hal ini tidak hanya dalam rangka pencegahan *milk borne disease*, tetapi juga memperkuat kepercayaan masyarakat terhadap susu. Pengawasan susu sapi ditujukan pada proses produksi susu mulai dari pemerahan susu sampai pada hasil susu yang siap dikonsumsi (Kusnoputranto, 1996).

Susu sapi merupakan bahan makanan yang baik untuk manusia dan juga untuk bakteri. Bakteri yang mengkontaminasi susu dalam waktu singkat akan berkembang biak mencapai jumlah yang banyak sehingga jumlah kasus infeksi dengan perantara susu cukup banyak, selain manusia juga memiliki daya resisten yang rendah. Upaya sanitasi terhadap susu merupakan salah satu upaya kesehatan lingkungan yang sangat penting (Chandra, 2006).

2.2.1. Kontaminasi pada Susu

Lukman dan Isroin (1986) mengemukakan bahwa pada saat susu meninggalkan puting sapi yang sehat, susu tersebut mengandung beberapa bakteri yang tertahan dari pembuluh susu dan tempat cadangan air. Selama proses pemerahan susu, bakteri biasanya bertambah dari berbagai

sumber. Bakteri dalam susu akan meningkat jumlahnya disebabkan oleh :

a. Kulit Sapi

Kulit dan bulu sapi yang kotor akan menunjang peningkatan jumlah bakteri dalam susu. Kotoran yang terkandung dalam kulit ternak umumnya terdiri dari kotoran sapi, debu, dan partikel tanah (Lukman dan Isroin, 1986).

b. Pemerah

Pada saat pemerah susu, pemerah harus menjaga kebersihan pakaian dan badan. Pemerah harus sehat dan tidak mempunyai luka serta mempunyai pengetahuan tentang hygiene dan sanitasi untuk mencegah terjadinya kontaminasi selama pemerahan. Pemerah disarankan agar bertempat tinggal di lingkungan yang tidak ada penderita TBC dan penyakit menular lainnya (Lukman dan Isroin, 1986).

c. Alat Pemerah

Alat-alat untuk pemerah yang digunakan harus bersih dan steril. Jika dalam alat pemerah terdapat residu susu, ini akan menyebabkan pertumbuhan bakteri pada peralatan. Alat pemerah juga harus disimpan secara baik dan diusahakan jangan sampai ada kotoran/debu yang menempel pada alat (Lukman dan Isroin, 1986).

d. Kandang dan Air

Kandang yang dibuat harus memenuhi syarat-syarat tertentu, antara lain: drainase dan ventilasi baik, lantai tidak licin, lantai miring, ada penampungan kotoran, dan ukuran kandang minimal 1,5 x 2,5 m²/ekor (Lukman dan Isroin, 1986). Air harus tersedia dalam jumlah cukup, jernih, dan bebas dari mikroorganisme. Air yang digunakan harus memenuhi standar fisik, kimia, bakteriologis, dan radiologis. Air yang tidak memenuhi syarat di atas dapat mengakibatkan kontaminasi pada puting dan ambing sehingga menyebabkan kontaminasi pada air susu (Lukman

dan Isroin, 1986).

2.3. Penanganan Susu Hasil Pemerahan

Sumoprastowo dan Zein (1990) menjelaskan bahwa susu hasil pemerahan diusahakan secepatnya mendapatkan penanganan agar tidak menurunkan mutu susu. Langkah pertama penanganan susu sesudah pemerahan adalah susu hasil pemerahan harus segera dikeluarkan dari kandang untuk menjaga susu tersebut tidak berbau sapi atau kandang. Keadaan ini penting terutama jika keadaan ventilasi kandang tidak baik. Susu tersebut kemudian harus disaring dengan saringan yang terbuat dari kapas atau kain penyaring dan ditampung dengan *milk can*. *Milk can* tersebut harus ditutup rapat segera setelah penyaringan. Kain penyaring harus dicuci bersih dan direbus, kemudian dijemur. Kain sebaiknya disetrika terlebih dahulu, jika kain penyaring tersebut hendak dipakai.

Susu perlu didinginkan secepat mungkin sesudah diperah dan disaring sekurang-kurangnya pada suhu 4°C sampai 7°C selama 2 atau 3 jam. Hal ini dilakukan untuk mencegah perkembangbiakan bakteri di dalam susu. Pendinginan dapat dilakukan dengan memakai balok es yaitu dengan memasukkan susu ke dalam bak yang berisi es balok dan ditutup rapat, apabila tidak memiliki alat pendingin (Sumoprastowo dan Zein, 1990).

2.4. Tinjauan *Escherichia coli*

Escherichia coli pertama kali dijelaskan oleh Dr. Theodor Escherich pada tahun 1885. Pada mulanya mikroba ini tidak dianggap sebagai organisme patogen karena bakteri ini ditemukan sebagai flora normal dalam usus manusia dan hewan berdarah panas, serta memainkan peranan yang penting dalam menjaga keadaan fisiologis usus. Tetapi, pada sekitar tahun 1940-an ditemukan bahwa bakteri ini dapat menyebabkan diare yang pada umumnya disebabkan oleh pengonsumsi air dan makanan yang tercemar. Karena itulah, bakteri ini kemudian dinilai sebagai bakteri penting dalam bahan pangan karena dapat ditularkan melalui makanan (Doyle and Padhye, 1989).

Escherichia coli penyebab diare ini dikelompokkan dalam 5 kategori berdasarkan mekanisme infeksi di dalam menimbulkan penyakit yaitu: *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) dan *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC). *Escherichia coli* O157:H7 termasuk kelompok EHEC yang pada manusia dapat menimbulkan penyakit *Haemorrhagic Colitis* (HC) yang bersifat verotoksigenik (Nataro and Kaper, 1998).

Escherichia coli pertama kali diidentifikasi sebagai bakteri patogen pada tahun 1982. Sebelum tahun 1982, *Escherichia coli* hanya pernah diidentifikasi di Amerika Serikat oleh Pusat Kontrol Penyakit Amerika pada tahun 1975 dari seorang pasien yang menderita kejang perut yang parah diikuti dengan diare berdarah. Setelah itu, dari tahun 1978 sampai 1982 telah ditemukan 6 isolat sitotoksik yang semuanya diisolasi dari penderita diare. Tetapi, karena keterbatasan data-data dan informai mengenai bakteri ini, maka belum dapat disimpulkan dari kejadian-kejadian tersebut bahwa *Escherichia coli* merupakan penyebab utama penyakit enterik (Nurairlyasti, 1999).

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif dan fakultatif anaerob yang bersifat patogen. Bakteri ini berbentuk batang pendek, berukuran $0,5 \times 1,0 - 3,0 \mu\text{m}$, dan tidak membentuk spora. Kedudukan satu sama lain umumnya sendiri-sendiri, tetapi dapat pula berpasangan atau rantai pendek (Vogt and Dippold, 2005).

2.5 Penggunaan Antibiotika di Bidang Peternakan

Perkiraan yang tepat untuk mengestimasi penggunaan antibiotika di bidang peternakan adalah sulit, hal ini disebabkan tidak adanya koleksi nasional tentang penggunaan antibiotika tersebut. Sebagai perbandingan tentang penggunaan antibiotika di Amerika Serikat, hampir 90% penggunaan antibiotika di bidang peternakan digunakan sebagai konsentrasi *subtherapeutic* dengan perbandingan 70% digunakan sebagai pencegahan penyakit dan sisanya sebagai faktor pendorong pertumbuhan (Levy, 2002).

Ada tiga kategori tentang penggunaan antibiotika dalam bidang kedokteran hewan yaitu sebagai pengobatan untuk mengatasi adanya penyakit, digunakan sebagai pencegahan (*prophylactic*) dalam resiko penyakit yang tinggi dan sebagai pendorong peningkatan produksi hewan ternak yang dikenal sebagai *subtherapeutic* (McAllister *et al.*, 2001). Meskipun lama waktu penggunaan berbeda antara tujuan sebagai *prophylactic* dan *subtherapeutic*, jumlah antibiotika yang dipakai umumnya sama yaitu 200 gram/ ton pakan (Levy, 2002). Keuntungan dari penggunaan antibiotika untuk promosi pertumbuhan hewan digambarkan oleh Sawant (2005) sebagai berikut : 1) memperbaiki pertumbuhan, 2) mengurangi resiko penyakit, 3) memperbaiki sistem digesti, 4) untuk penggemukan hewan, dan 5) pengurangan waktu dan jumlah pakan dalam mencapai berat badan ideal untuk dipotong.

Beberapa golongan antibiotika disetujui penggunaannya dalam pakan ternak termasuk di dalamnya golongan betalaktam (penisilin, ampisilin, *cephalosporin*), golongan tetrasiklin, golongan aminoglikosida, golongan makrolida (eritromisin) dan sulfonamida. Kebanyakan golongan betalaktam digunakan dalam pengobatan mastitis yang termasuk di dalamnya adalah penisilin G, amoksisilin, *cloxacillin* dan *hetacillin* yang penggunaannya sebagai preparat *intra mammary* (Sawant, 2005).

Antibiotika lainnya yang sering digunakan dalam pengobatan mastitis adalah eritromisin yang bisa digunakan dalam masa laktasi atau masa kering, sementara tetrasiklin merupakan antibiotika penting yang digunakan dalam peternakan sapi perah sebagai tambahan minuman pengganti susu untuk anak sapi (Heinrichs *et al.*, 1995) yang berfungsi untuk meningkatkan pertambahan berat badan anak sapi. Lebih dari 60% peternakan sapi perah di Amerika Serikat menggunakan antibiotika dalam minuman pengganti susu, dan chlortetrasiklin dan oksitetrasiklin adalah paling banyak digunakan sebagai bagian antibiotika tambahannya.

Tetrasiklin adalah sangat lebar daya kerja yang meliputi hampir semua bakteri Gram positif dan Gram negatif yang patogen. Mekanisme kerjanya melalui penghambatan sintesis protein bakteri (Skočková, *et al.*, 2012), eritromisin berkasiat bakteristatik terutama terhadap Gram positif dengan mekanisme kerja melalui penghambatan sintesis protein bakteri (Tjay dan Rahardja, 1986),

dan *ciproxin* termasuk golongan *fluoroquinolone* dengan daya kerja meliputi hampir semua bakteri Gram positif dan Gram negatif yang patogen dan mekanisme kerjanya melalui penghambatan dari *DNA gyrase* bakteri (Harms *et al.*, 2003).

Pada dasarnya mekanisme kerja antibiotika dibagi menjadi tiga (Sawant, 2005): 1) Penghambatan biosintesis dinding sel. Dinding sel bakteri mengandung *peptidoglycan*, merupakan rantai peptida dan *glycan* yang secara kovalent *crosslinked*. Hubungan tersebut memerlukan enzim *transpeptidase* untuk merapatkannya (Walsh, 2000). Antibiotika betalaktam (penisilin, ampisilin dan *cephalosporin*) mengikat enzim *transpeptidase* dan menghambat sintesis dinding sel. Enzim *transpeptidase* disebut juga *penicillin-binding proteins* (Walsh, 2000).

2) Penghambatan sintesis protein. Beberapa kelas antibiotika mampu untuk mempengaruhi sintesis protein dalam ribosom (Sawant, 2005). Ribosom bakteri terdiri dari dua sub unit yaitu 50S dan 30S sub unit (Harms *et al.*, 2003). Antibiotika dapat menghambat sintesis protein dengan beberapa tipe antara lain penghambat kode protein atau *A-site*. Tetrasiklin mengikat *A-site* yang berarti mencegah perpindahan tRNA (Harms *et al.*, 2003), sedangkan eritromisin mengikat *polypeptide export tunnel* dan menghambat perpanjangan rantai poli peptida (Sawant, 2005).

3) Penghambatan replikasi dan perbaikan DNA. *Fluoroquinolones* adalah antibiotika sintesis yang membunuh bakteri melalui target enzim *DNA gyrase* dan *topoisomerase* (Harms *et al.*, 2003). *DNA gyrase* adalah enzim yang bertanggungjawab untuk berhasilnya replikasi DNA. *Quinolones* mengikat enzim *DNA gyrase* sehingga replikasi DNA terganggu.

2.5.1. Antibiotika Betalaktam

Penisilin merupakan sebuah kelompok dari antibiotika alami dan antibiotika semisintetik yang mempunyai cincin betalaktam dan merupakan bagian dari cincin *thiazolidine* (Yao and Moellering, 1991). Aksi dari antibiotika penisilin didasarkan pada kemampuan untuk menghambat sejumlah enzim dari bakteri yang dikenal sebagai *penicillin binding proteins* (PBPs) yang esensial untuk sintesis *peptidoglycan* (Hassan, *et al.*, 2010).

Antibiotika betalaktam menghambat pertumbuhan bakteri melalui *blocking* tahap awal pada sintesis dinding sel yang terkait secara *cross-linking* dengan polimer *peptidoglycan* oleh *transpeptidase* (Sawant, 2005). Polimer *peptidoglycan* adalah bahan yang penting pada dinding bakteri yang dibentuk dengan pengantian residu dari *N-acetylglucosamine* dan *N-acetylmuramic* (Walsh, 2000).

Penisilin G dan V adalah antibiotika betalaktam pertama yang diperkenalkan dan efektif melawan bakteri Gram positif, tetapi dalam beberapa tahun setelah dipasarkan, *Staphylococcus aureus* yang menghasilkan penisilinase menampakkan resistensinya terhadap antibiotika tersebut (Sawant, 2005). Penisilin semi sintetik seperti ampisilin lebih efektif dibandingkan penisilin (Sawant, 2005), tetapi tahun 1965 terdapat sebuah *plasmid borne betalactamase* (TEM-1) yang bertanggung jawab atas resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap ampisilin, kemudian diikuti oleh SHV-1, TEM-2, dan OXA-1 yang juga merupakan *plasmid borne betalactamases* secara meluas tersebar ke populasi bakteri. Pada awal 1970, penyandi gen *AmpC beta lactamase* dari kromosom pertama kali dilaporkan yang dapat menginaktifkan ampisilin dengan cepat (Livermore, 1995).

Cephalosporin merupakan sebuah kelompok antibiotika yang termasuk derivat dari produk fermentasi dari jamur *Cephalosporium* (Yao and Moellering, 1991). Struktur dari cephalosporin terdiri dari sebuah cincin betalaktam yang merupakan bagian dari cincin dihidrothiazine. *Cephalosporin* mengikat PBPs, berarti juga menghambat pembentukan sintesis *peptidoglycan* untuk pembentukan dinding bakteri (Taylor, 2001).

Perpindahan gen horizontal adalah mekanisme yang memungkinkan bakteri untuk menggunakan materi genetik secara bersama yang menyebabkan perpindahan resistensi antibiotika meliputi *conjugation*, *transduction* dan *transformation* (Rice, 2000). Mekanisme resistensi terhadap antibiotika dikelompokkan menjadi a) penurunan penetrasi melalui membran bakteri, b) inaktivasi antibiotika, c) perubahan tempat target dan d) pemompaan keluar secara aktif antibiotika

dari bakteri (Taylor, 2001). Obat dengan kelas yang mirip mempunyai kesamaan mekanisme resistensi dan sering terjadi *cross-resistance* (Shakya, et al., 2013)

Mekanisme resistensi terhadap antibiotika yang umum adalah produksi enzim yang menginaktivasi atau memodifikasi antibiotika. Sebagai contoh adalah produksi betalaktamase oleh beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif. Beberapa golongan betalaktamase dapat menyebabkan degradasi antibiotika betalaktam (penisilinase, *cephalosporinase*). Mekanisme bakteri menjadi resistan terhadap antibiotika sering merefleksikan mekanisme antibiotika dalam membunuh bakteri. Setelah antibiotika penetrasi ke dalam dinding sel atau membran dari bakteri, yang menjadi target adalah enzim bakteri sebagai contoh *penicillin binding protein* atau *DNA gyrase* atau ribosom yang berpengaruh pada sintesis protein atau replikasi (Wose Kinge, et al., 2010).

Pergantian dalam tempat target adalah mekanisme yang umum lainnya, antibiotika betalaktam mengikat PBPs yang merupakan enzim yang terkait dalam sintesis dinding sel bakteri. Melalui pengikatan PBPs, antibiotika mengintervensi sintesis dinding sel yang menyebabkan penghambatan dalam pembelahan sel bakteri. Perubahan dalam PBPs dapat menyebabkan perkembangan resistensi terhadap antibiotika betalaktam (Aly, et al., 2012).

2.6 Pengujian Resistensi Terhadap Antibiotika

Tujuan dari uji *antimicrobial susceptibility* adalah untuk memprediksi secara *in vivo* sukses atau tidaknya suatu pengobatan. Pengujian dirancang untuk mengukur respon pertumbuhan dari sebuah isolat mikroorganisme yang terpapar antibiotika tertentu di bawah kondisi baku. Hasil dari uji *antimicrobial susceptibility* harus dikombinasikan dengan informasi klinis dan pengalaman ketika memberikan antibiotika yang cocok (Thornsberry, 1991). Metode *disk diffusion* (Kirby Bauer *disk assay*) merupakan sistem yang tepat untuk pengujian beberapa antibiotika dari suatu isolat bakteri (Thornsberry, 1991). Pertumbuhan mikroorganisme dan difusi antibiotika secara serempak menghasilkan zona inhibisi yang bundar. Diameter zona inhibisi adalah fungsi dari suatu antibiotika

dalam disk dan kepekaan dari mikroorganisme. Pengujian ini harus baku dengan tepat karena zona tergantung pada jumlah inokulum, komposisi media, temperatur inkubasi, kelembaban dan ketebalan agar (Taylor, 2001). Jika kondisinya terkendali dengan baik, pengujian dapat dilaksanakan dan diameter zona adalah fungsi dari kepekaan mikroorganisme terhadap antibiotika. Diameter zona dapat dikorelasikan dengan kepekaan suatu mikroorganisme terhadap antibiotika yang diukur dengan metode difusi. Selanjutnya korelasi menetapkan mikroorganisma tersebut sensitif, *intermediate* dan resisten terhadap konsentrasi tertentu dari antibiotika (Livermore *et al*, 2001).

Kategori sensitif berakibat bahwa suatu infeksi dapat diobati dengan dosis biasa dari antibiotika yang diuji untuk tipe infeksi yang sedang berjalan secara klinis. Kategori resisten memberi prediksi gagalnya pengobatan dengan antibiotika tersebut (Livermore, 2001). Kategori *intermediate*, merupakan zona antara kategori sensitif dan kategori resisten.

2.7 *Multiplex Polymerase Chain Reaction*

Polymerase Chain Reaction ini merupakan teknik perbanyakan DNA secara *in vitro*. Sedangkan, *Multiplex Polymerase Chain Reaction* merupakan teknik perbanyakan lebih dari satu jenis untai DNA secara *in vitro*. Teknik ini memungkinkan adanya amplifikasi antara dua region DNA yang diketahui, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). Dalam sistem kerjanya, PCR dilandasi oleh struktur DNA. Dalam keadaan nativenya, DNA merupakan double helix, yang terdiri dari dua buah pita yang berpasangan antiparalel antara satu dengan yang lain dan berikatan dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terbentuk antara basa-basa yang komplementer, yaitu antara basa Adenin (A) dengan Thymine (T), dan Guanine (G) dengan Cytosin (C). Basa-basa itu terikat dengan molekul gula, deoksiribosa, dan setiap satu molekul gula berikatan dengan molekul gula melalui ikatan fosfat (Gaffar, 2007).

2.7.1. Tahapan PCR

Terdapat tiga tahap utama di dalam setiap siklusnya (Gaffar, 2007), yaitu :

2.7.1.1. Denaturasi

Selama proses denaturasi, double stranded DNA akan membuka menjadi single stranded DNA. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusannya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya (Gaffar, 2007).

2.7.1.2. Annealing

Primer akan menuju daerah yang spesifik, dimana daerah tersebut memiliki komplemen dengan primernya. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk. Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72°C (Gaffar, 2007).

2.7.1.3. Reaksi Polimerisasi (Ekstensi)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan dengan dNTP yang komplemen pada sisi 3'nya. Jadi, seandainya ada 1 copy gene sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial (Gaffar, 2007).

2.7.2. Komponen PCR

Dalam sejarahnya, PCR dilakukan dengan menggunakan Klenow fragment DNA polymerase I selama reaksi polimerisasinya. Enzyme ini ternyata tidak aktif secara termal selama proses denaturasi, sehingga peneliti harus menambahkan enzyme di setiap siklusnya. Selain itu, enzim ini hanya bisa dipakai untuk perpanjangan 200 bp. Selain itu, oleh karena suhu annealing

yang rendah dan ekstensi yang hanya bisa dilakukan pada 37°C (suhu kerja Klenow fragment), hasilnya menjadi kurang spesifik (Gaffar, 2007).

Untuk mengatasi kekurangan tersebut, dalam perkembangannya kemudian dipakai enzim Taq polymerase yang memiliki keaktifan dalam suhu tinggi. Oleh karenanya, penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklusnya, dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007).

Pemakaian Taq polymerase dalam konsentrasi yang terlalu besar akan mengakibatkan munculnya background produk non-spesifik. Sebaliknya, bila konsentrasi Taq polymerase terlalu rendah, maka proses amplifikasi berlangsung secara inefisien, dan produk amplifikasi yang diperoleh akan mempunyai konsentrasi yang relatif rendah (Gaffar, 2007).

Apabila memungkinkan primer yang dipilih adalah yang mengandung G+C sekitar 50%. Apabila memungkinkan, dihindari adanya polipurin atau polipirimidin. Selain itu, juga dihindari adanya struktur sekunder dan adanya komplementari antara primer-dimer (Gaffar, 2007).

Selain enzim dan primer, terdapat juga komponen lain yang ikut menentukan keberhasilan reaksi PCR. Komponen tersebut adalah dNTP untuk reaksi polimerisasi, dan buffer yang mengandung MgCl₂. Konsentrasi ion Mg²⁺ dalam campuran reaksi merupakan hal yang sangat kritis. Konsentrasi ion Mg²⁺ ini sangat mempengaruhi proses primer annealing, denaturasi, spesifisitas produk, aktivitas enzim dan fidelitas reaksi. Oleh sebab itu, penambahan berbagai pereaksi harus selalu diperhatikan, jangan sampai ada ion-ion lain maupun chelating agent yang dapat mengganggu konsentrasi ion Mg²⁺ dalam larutan. Secara umum, sebaiknya konsentrasi ion Mg²⁺ bebas yang terdapat dalam larutan adalah sekitar 2 mM (Gaffar, 2007).

BAB 3 METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

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)

Materi Penelitian

3.1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu dan yang diambil dari 4 peternakan sapi perah di Jawa Timur. Bahan lainnya adalah bahan yang digunakan dalam kultur bakteri, ekstraksi DNA, dan amplifikasi dengan *Multiplex Polymerase Chain Reaction* : EMBA, *Lactose Broth*, BPS, TE buffer, enzim lysostaphin, proteinase K, air, primer, dNTPs, 10X thermophilic 2 buffer (Promega), MgCl₂, Taq polymerase, air suling steril, larutan loading, gel agarosa 1,5%, dan *marker*.

3.2. Alat penelitian

Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel meliputi tabung reaksi, beker glass, kapas, pipet hisap, termos (*ice box*). Peralatan yang digunakan untuk kultur bakteri, ekstraksi DNA, dan amplifikasi dengan *Multiplex Polymerase Chain Reaction* meliputi tabung reaksi, sentrifus, microtube, mesin *thermocycler*, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, pipet mikro, vortex, sentrifugator microtube, lemari pendingin, autoklaf, inkubator, dan perangkat elektroforesis.

3.3. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

3.3.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel menggunakan metode *Purposive Sampling* yaitu cara penarikan sampel yang dilakukan dengan memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti.

Sampel susu diambil dari 4 peternakan sapi perah dari daerah Jawa Timur yang memiliki sanitasi yang buruk dengan kriteria (Lukman dan Isroin, 1986) antara lain: (a). kulit dan bulu sapi yang kotor, (b) Pemerah tidak menjaga kebersihan pakaian dan badan, (c) Alat pemerah yang tidak bersih dan tidak disimpan dengan baik, dan (d) kandang tidak benar-benar terjaga kebersihannya. Sebagai pembanding diambil sampel susu dari peternakan yang berada di kota Surabaya. Pengambilan sampel susu pada saat pemerahan pagi hari yaitu pukul 04.00–06.00 WIB. Setiap peternakan diambil satu buah sampel susu sebanyak 10 ml yang diambil dari *milk can* setelah pemerahan selesai. Tiap sampel susu ditempatkan pada tabung reaksi steril dan ditutup dengan kapas steril, kemudian dimasukkan ke dalam termos (*ice box*).

3.3.2. Pemeriksaan Sampel

Sampel susu diperiksa tingkat cemaran *Escherichia coli* dengan menggunakan uji *Most Probable Number* (MPN). Sartika dkk. (2005), menjelaskan bahwa prosedur MPN diawali dengan mengencerkan sampel susu menjadi 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} . Setiap pengenceran selanjutnya diinokulasi per ml ke dalam 5 tabung reaksi berisi 10 ml *Brilliant Green Bile Broth* (BGBB, semuanya 15 tabung) yang di dalam masing-masing tabung reaksi sudah dimasukkan tabung Durham dengan maksud untuk menangkap gas yang diproduksi oleh bakteri. Ke-15 tabung tersebut diinkubasi pada 37°C selama 48 jam. BGBB dalam tabung reaksi yang menunjukkan kekeruhan, warna hijau kekuningan serta produksi gas dan asam diduga positif koliform. Kemudian, dengan ose, semua tabung diinokulasi ke dalam 10 ml BGBB dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 48 jam. Setiap tabung yang menunjukkan produksi gas, diduga positif *Escherichia coli*. Kemudian, semua tabung di atas diinokulasi dengan cara streak pada media EMBA (5 area pada setiap cawan petri) dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Koloni khas *Escherichia coli* pada media EMBA berwarna hijau metalik. Setelah itu, identifikasi koloni khas pada *Tryptone Water* (setiap area pada 1 tabung) dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam untuk meyakinkan bahwa koloni tersebut benar-benar *Escherichia coli*. *Tryptone Water* yang sudah diinkubasi selanjutnya ditetesi dengan Reagen Kovac

sebanyak dua atau tiga tetes. Uji positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan *Tryptone Water*. Tingkat cemaran *Escherichia coli* ditentukan dengan menghitung jumlah tabung *Tryptone Water* yang positif dari setiap pengenceran, kemudian dicocokkan dengan tabel *Mc Crady*.

3.4. Uji Sensitifitas Antibiotika

Uji sensitifitas antibiotika menggunakan metode Kirby-Baurer yang menggunakan *Agar disk diffusion*, menghasilkan katagori yang bersifat kualitatif dengan penilaian sensitif, intermediete dan resisten (Lopez *et al.*, 2000).

1. Cara Kerja Uji Sensitifitas :

a. Kultur Kuman

Biakan kuman yang diperoleh dari koloni yang di media *Blood Agar*. Kemudian ditanam pada tabung reaksi yang berisi 5 ml BPW (*Buffer Pepton Water*), diinkubasi pada suhu 37oC selama 24 jam, atau sampai didapatkan kekeruhan yang sama dengan standart Mc.Farland II.

b. Uji sensitifitas

Penanaman pada lempeng agar dilakukan dengan mencelupkan lidi kapas steril kedalam biakan bakteri. Tekan kapas pada dinding tabung untuk memeras kelebihan cairan kemudian diusapkan pelan-pelan pada seluruh permukaan media MHA (*Mueller Hinton Agar*). Kuman dibiarkan menempel pada media selama 5 menit, lalu cakram antibiotika penisilin, metisilin, ampisilin, tetrasiklin dan eritromisin diletakkan secara bersamaan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*). Cakram ditekan sedikit pada permukaan media supaya obat dapat meresap dengan baik. Biakan bakteri diinkubasi 37°C selama 24 jam.

2. Pembacaan Hasil

Daerah hambatan antibiotika terhadap pertumbuhan kuman diukur menggunakan penggaris dengan satuan mm. Hasilnya dibaca menurut pedoman yang dikeluarkan oleh *World Health Organization* (2003).

3.5. Kultur Bakteri

Masing-masing sampel susu ditanam pada media EMBA dengan cara streak dan diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Koloni khas *Escherichia coli* termasuk *Escherichia coli* O157:H7 pada media EMBA berwarna hijau metalik. Setelah itu, koloni khas *Escherichia coli* yang tumbuh di EMBA diambil dengan menggunakan ose dan ditanam lagi di dalam *Lactose Broth* 15 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk memperbanyak jumlah bakteri *Escherichia coli* (Sudrajat dkk., 2000).

3.6. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA *Escherichia coli* diawali dengan melakukan sentrifus 5000 rpm selama 10 menit pada tabung reaksi yang berisi 5 ml *Lactose Broth* dan kultur sel *Escherichia coli*. Pencucian pada sedimen yang terbentuk dilakukan setelah sentrifus selesai. Pencucian ini dilakukan dengan cara membuang filtrat dan mengisi kembali tabung tersebut dengan 5 ml BPS, kemudian disentrifus 5000 rpm selama 10 menit. Pencucian sedimen ini diulangi sebanyak tiga kali dengan cara yang sama.

Sedimen yang terbentuk setelah pencucian dipindahkan ke dalam microtube. Tambahkan ke microtube 100 µl TE buffer (10 mm of Tris HCl, 1 mm of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0) diikuti dengan penambahan 5 µl enzim lysostaphin serta campur dan inkubasi selama 1 jam pada 37° C. Lakukan perlakuan dengan 10 µl proteinase K selama 2 jam pada 56° C, selanjutnya enzim proteinase K diinaktifkan dengan mendidihkan selama 10 menit dan didinginkan pada es selama 2 menit. Lakukan sentrifugasi 13.000 rpm selama 3 menit dan supernatan siap digunakan untuk PCR (Momtaz, 2012).

3.7. Amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction*

Reagen untuk PCR terdiri dari masing-masing 1,7 µl untuk primer (tabel 1); 1 µl DNTPs, 5 µl 10X thermophilic 2 buffer (Promega), 3 µl Mg Cl₂, 0,2 µl Taq polymerase dan 29,8 µl air suling

steril disiapkan dalam tabung microtube 0,5 ml. 4,2 µl preparat DNA ditambahkan ke dalam tabung microtube tersebut (Momtaz, 2012). Campuran reagen PCR tersebut kemudian dimasukkan dalam *thermocycler* dengan program suhu sebagai berikut: inkubasi awal 94°C selama 5 menit diikuti 94°C untuk denaturasi selama 1 menit, annealing pada 52°C selama 30 detik, elongasi 72°C selama 1 menit, dan ekstensi pada 72°C selama 10 menit sebanyak 40 kali (Momtaz *et al.*, 2012).

Masing-masing 5 µl produk amplifikasi dicampur dengan 2 µl larutan loading sampai tercampur dengan baik. Masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tanki yang berisi buffer TE. Dimasukkan juga *marker* ke dalam sumur gel agarosa untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 75 volt. Elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV) setelah 1 jam. Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda (Momtaz *et al.*, 2012).

Table 1. *Escherichia coli* antimicrobial resistant genes and primer sequences used for PCR identification

Antimicrobial agent	Resistance gene	Sequence	Size (bp)	Annealing temperature (°C)	References
Streptomycin	<i>aadA1</i>	(F) TATCCAGCTAAGCGGAACT (R) ATTTGCCGACTACCTTGTC	447	58	Van et al. 2008
Gentamicin	<i>aac(3)-IV</i>	(F) CTCAGGATGGCAAGTTGGT (R) TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	286	55	Van et al. 2008
Sulfonamide	<i>sul1</i>	(F) TTCGGCATTCTGAATCTCAC (R) ATGATCTAACCCCTCGGTCTC	822	47	Van et al. 2008
Beta-lactams	<i>bla_{SHV}</i>	(F) TCGCCTGTGTATTATCTCCC (R) CGCAGATAAATCACCAATG	768	52	Van et al. 2009
	<i>bla_{CMV}</i>	(F) TGGCCAGAAGTACAGGCAAA (R) TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	47	Van et al. 2008
Erythromycin	<i>ere(A)</i>	(F) GCCGGTGCTCATGAACCTGAG (R) CGACTCTATTCGATCAGAGGC	419	52	Van et al. 2008
Chloramphenicol	<i>catA1</i>	(F) AGTTGCTCAATGTACCTATAACC (R) TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547	55	Van et al. 2008
	<i>cmfA</i>	(F) CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC (R) CACCTTGCTGCCCATCATTAG	698	55	Van et al. 2008
Tetracycline	<i>tet(A)</i>	(F) GGTTCACCTCGAACGACGTCA (R) CTGTCCGACAAGTTGCATGA	577	57	Randall et al. 2004
	<i>tet(B)</i>	(F) CCTCAGCTTCTCAACGCGTG (R) GCACCTTGCTGATGACTCTT	644	56	Randall et al. 2004
Trimethoprim	<i>dhfrA1</i>	(F) GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC (R) GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	367	45	Toro et al. 2005
Quinolones	<i>qnrA</i>	(F) GGGTATGGATATTATTGATAAAG (R) CTAATCCGGCAGCACTATTTA	670	50	Mammeri et al. 2005

(Momtaz *et al.*, 2012)

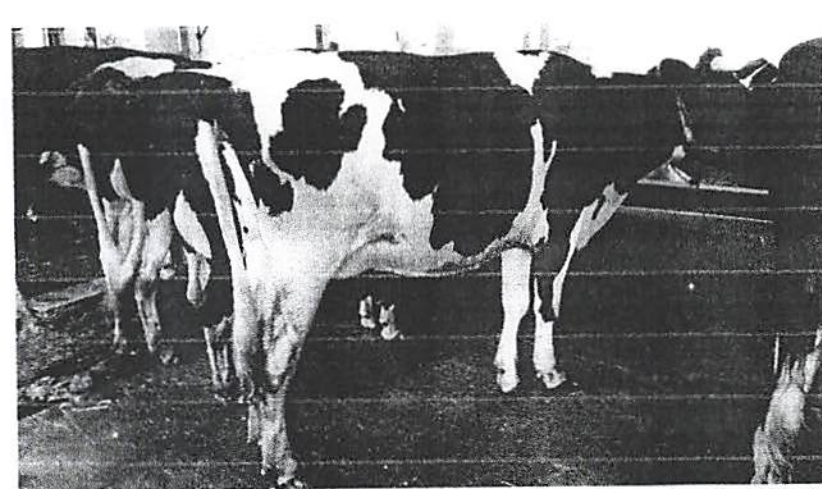
LUARAN PENELITIAN

1. Data tentang adanya isolat *Escherichia coli* yang resisten terhadap beberapa antibiotika berasal dari susu segar di Jawa Timur. merupakan data yang amat penting guna penatalaksanaan pengobatan infeksi pada masyarakat Jawa Timur yang gemar minum susu segar.
2. Ditemukannya gen penyandi resistensi antibiotika *Escherichia coli* dari susu segar di Jawa Timur merupakan dasar teori baru tentang penyebaran gen penyandi resistensi antibiotika *Escherichia coli* yang bersumber dari hewan dalam hal ini adalah susu segar. Untuk pengendalian penyebaran gen penyandi resistensi antibiotika *Escherichia coli* diperlukan kerjasama yang intensif antara instansi yang terkait dengan memperhatikan adanya pola zoonosis yang bersumber dari hewan.
3. Sebagai bahan untuk diterbitkan pada nasional yang terakreditasi ataupun jurnal internasional.

BAB 5. HASIL YANG DICAPAI

5.1. Hasil Koleksi Sampel

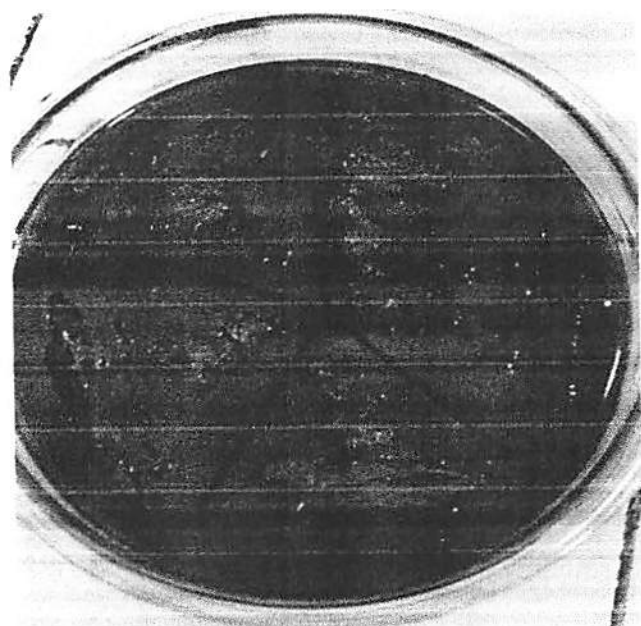
Koleksi sampel yang dilakukan pada beberapa peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan mengambil 128 sampel susu dari 4 peternakan sapi perah yang berbeda. Peternakan sapi perah dari Surabaya juga diambil susunya untuk dilacak keberadaan bakteri *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Betalactamase*. Adapun kondisi peternakan sapi perah dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1. Kandang Salah Satu Peternakan Sapi Perah di Batu

Tabel 5. 1. Hasil Uji Identifikasi *Escherichia coli*

Lokasi	Jumlah Sample	Positif BGBB	Positif EMBA	Positif INDOL	Positif PEWARNAAN
Nongkojajar	23	19	13	13	13
Grati	33	31	26	26	26
Batu	39	30	30	30	30
Senduro	32	29	25	25	25
Jumlah	128	109	94	94	94



Gambar 5. 2. Media EMBA yang ditumbuhi *Escherichia coli*.

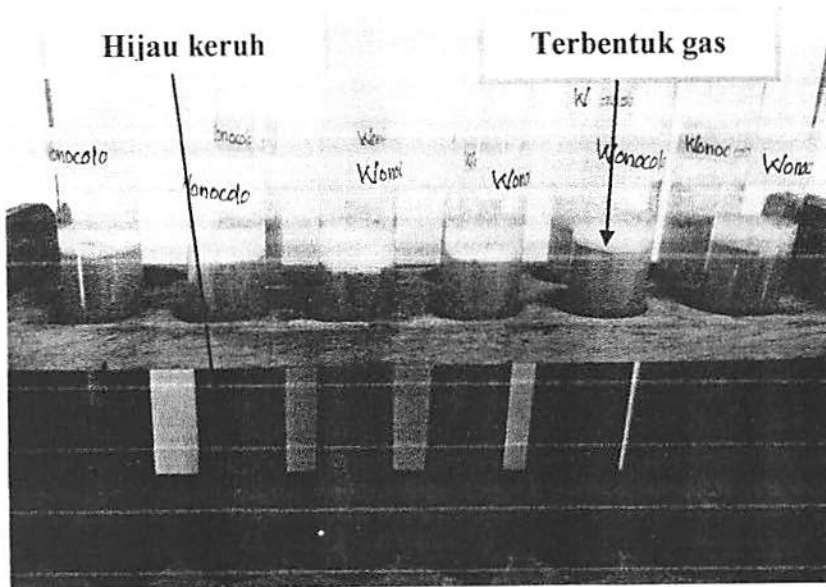
Berdasarkan hasil uji identifikasi tersebut menunjukkan bahwa terdapat 94 (73,44%) isolat *Escherichia coli* dari 128 sampel susu, sedangkan sampel dari peternakan sapi perah Surabaya dapat dilihat dari tabel 5.1.

Tabel 5. 2. Daftar Peternakan Tempat Pengambilan Sampel Susu yang positif *Escherichia coli* di Surabaya

No	Peternakan	Jumlah Sampel	Uji BGGB		Uji EMBA		Uji Indol	
			+	-	+	-	+	-
1	Kaliwaron	20	20	0	11	9	11	9
2	Wonocolo	15	15	0	7	8	7	8
3	Kebraon	20	20	0	17	3	17	3
4	Pogot	15	15	0	8	7	8	7
Jumlah		70	70	0	43	27	43	27

Dari tabel 5. 2 terlihat bahwa dari empat peternakan yang berada di wilayah Surabaya diantaranya: Kaliwaron, Wonocolo, Kebraon, dan Pogot masing-masing diambil Kaliwaron 20 sampel, Wonocolo 15 sampel, Kebraon 20 sampel, Pogot 15 sampel, kemudian dilakukan penanaman pada media BGGB yang diinkubasi 37°C selama 24-48 jam mengalami perubahan warna dari hijau jernih menjadi hijau keruh dan menghasilkan gas, yang dapat dikatakan adanya indikasi bakteri koliform. Kemudian sampel dari media BGGB dilakukan penanaman pada media

EMBA, sampel yang suspect *Escherichia coli* akan berwarna hijau metalik. Pada peternakan Kaliwaron terdapat 16 sampel yang menunjukkan suspect *Escherichia coli*, sedangkan pada peternakan Wonocolo terdapat 9 sampel, pada peternakan Kebraon terdapat 17 sampel dan pada peternakan Pogot terdapat 8 sampel. Gambar media BGGB yang mengalami perubahan warna hijau keruh dan terbentuknya gas dapat dilihat pada Gambar 5. 3.

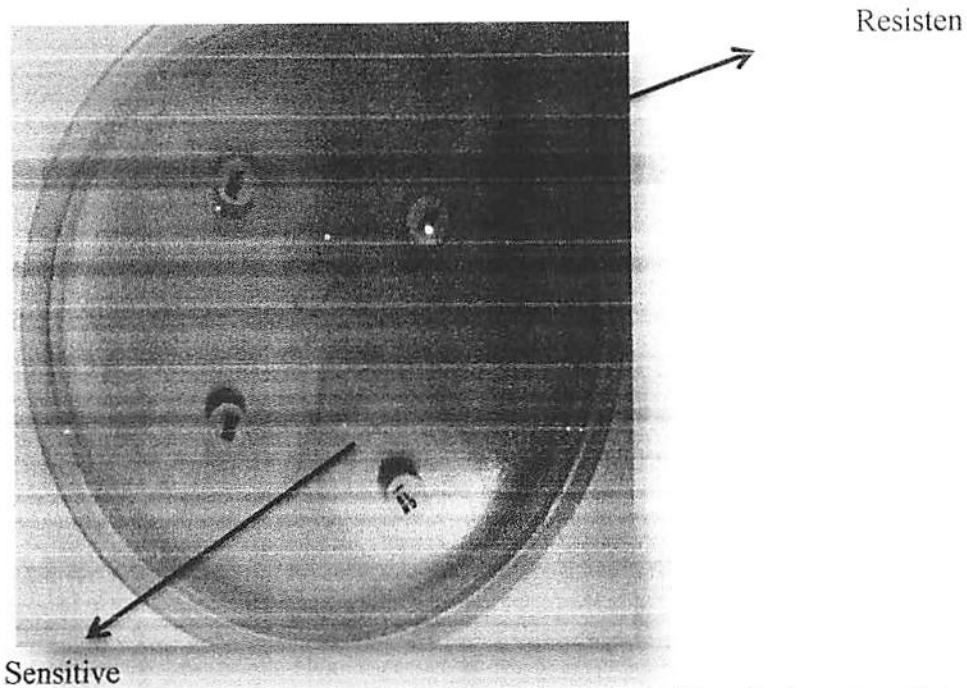


Gambar 5. 3. Media BGGB berwarna hijau keruh dan menghasilkan gas.

Pada media EMBA koloni bakteri yang berwarna hijau metalik dapat dikatakan *suspect Escherichia coli*. Berikutnya 70 sampel yang positif dari hasil media BGGB yang ditanam pada media EMBA, hanya 43 sampel yang positif terdapat koloni berwarna hijau metalik setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, seperti yang terlihat pada Gambar 5.2.

5.3. Uji Sensitifitas *Escherichia coli* Terhadap Antibiotik

Isolat *Escherichia coli* yang sudah didapatkan dari pengujian sebelumnya digunakan untuk keperluan uji sensitifitas terhadap 4 antibiotik yaitu eritromisin, oksitetrasiklin, gentamisin, dan kloramfenikol. Pembacaan hasil dari uji sensitifitas ini dilakukan dengan cara mengukur dan membandingkan zona bening yang terbentuk dengan zona standart menurut *Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI 2012)*.



Gambar 5. 4. Zona inhibisi (bening) uji sensitifitas *Eschericia coli* terhadap antibiotik pada media MHA.

Tabel 5. 3. Hasil Uji Sensitifitas *Eschericia coli* Terhadap Antibiotik.

No	Susu	Antibiotik (oxid)			
		Eritromisin 30 µg %	Oksitetrasiklin 30 µg %	Gentamisin 10 µg %	Kloramfenikol 30 µg %
1	N	R : 100% I : 0% S : 0%	R : 23,1% I : 23,1% S : 53,8%	R : 23,1% I : 46,1% S : 30,8%	R : 0% I : 0% S : 100%
2	G	R : 100% I : 0% S : 0%	R : 15,4% I : 19,2% S : 65,4%	R : 30,8% I : 46,1% S : 23,1%	R : 0% I : 0% S : 100%
3	B	R : 100% I : 0% S : 0%	R : 16,7% I : 10% S : 73,3%	R : 30% I : 36,8% S : 33,2%	R : 0% I : 0% S : 100%
4	S	R : 100% I : 0% S : 0%	R : 16% I : 16% S : 68%	R : 20% I : 52% S : 28%	R : 0% I : 0% S : 100%

Keterangan : N: Isolat yang berasal dari Nongkojajar (Kabupaten Pasuruan), G: Isolat yang berasal dari Grati (Kabupaten Pasuruan), B: Isolat yang berasal dari Batu (Kota Batu), S: Isolat yang berasal dari Senduro (Kabupaten Lumajang).

Berdasarkan tabel 5. 3 dapat disimpulkan bahwa isolat *Eschericia coli* sebanyak 100% mengalami resistensi terhadap eritromisin, sedangkan terhadap kloramfenikol sebanyak 100% isolat masih sensitif. Data tersebut juga menunjukkan bahwa isolat *Eschericia coli* juga masih sensitif terhadap oksitetrasiklin. Hal ini terbukti dari 53,8% isolat N, 65,4% isolat G, 73,3% isolat B, dan 68% isolat S yang masih sensitif terhadap oksitetrasiklin. Uji sensitifitas terhadap antibiotik gentamisin menunjukkan hasil intermediet dimana isolat N dan G memiliki persentase yang sama yaitu sebanyak 46,1%, 36,8% untuk isolat B, dan 52% untuk isolat S.

Tabel 5. 4. Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik E. coli dari peternakan Surabaya

No	Susu	Antibiotik (oxid)				
		Ampisilin 30 µg (sampel)	Siprofloksasi n5 µg (sampel)	Gentamisin 10 µg (sampel)	Kloramfen ikol 30 µg (sampel)	Trimetoprim 5 µg (sampel)
1	P	R: 100% (8) I: 0% (0) S: 0% (0)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (8)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (8)	R: 37,5% (3) I: 50% (4) S: 12,5% (4)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (8)
2	KB	R: 100% (17) I: 0% (0) S: 0% (0)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (17)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100%(17)	R: 29% (5) I: 6% (1) S: 65% (11)	R: 0% (0) I: 65% (11) S: 35% (6)
3	KA	R: 100%(13) I: 0% (0) S: 0% (0)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (13)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100%(13)	R: 23% (3) I: 15% (2) S: 62% (8)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100%(13)
4	W	R: 100% (7) I: 0% (0) S: 0% (0)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (7)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (7)	R: 57% (4) I: 43% (3) S: 0% (0)	R: 0% (0) I: 0% (0) S: 100% (7)

Ket.: S : *Sensitive*, I : *Intermediate* dan R : *Resistance*.

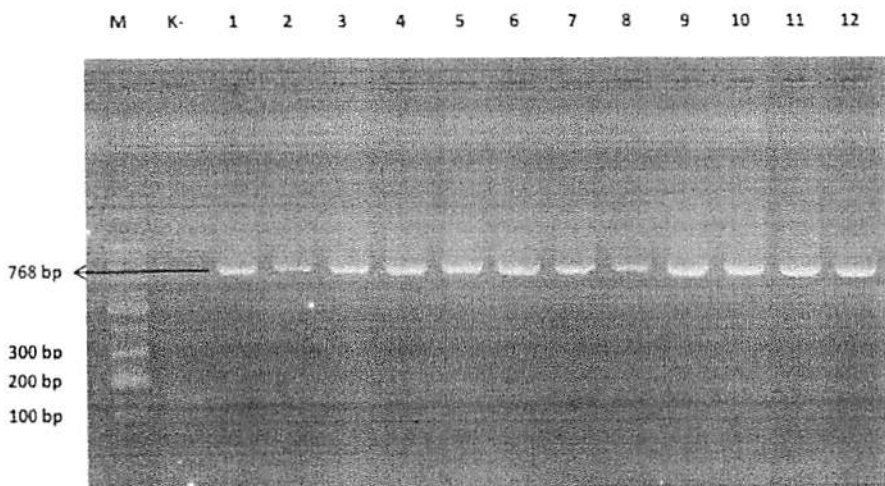
P : Pogot, KB : Kebraon, KA: Kaliwaron, dan W : Wonocolo.

Pada Tabel 5. 4 menunjukkan sebanyak 43 sampel yang resisten terhadap ampisilin 10 µg dengan ukuran zona hambat ≤ 13 mm. Terdapat 1 sampel yang resisten terhadap antibiotik Siprofloksasin 5 µg dengan ukuran zona hambat ≤ 15 mm. Tidak terdapat sampel yang resisten terhadap antibiotik gentamisin 10 µg dengan ukuran zona hambat ≤ 12 mm. Terdapat 15 sampel

yang resisten terhadap antibiotik kloramfenikol 30 µg dengan ukuran zona hambat \leq 12 mm. Tidak terdapat sampel yang resisten terhadap antibiotik trimetoprim 5 µg dengan ukuran zona hambat \leq 10 mm. Diameter zona hambat tersebut dalam satuan millimeter (mm) disesuaikan berdasarkan CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

5.3. Hasil Elektroforesis Produk *Polymerase Chain Reaction*

Hasil dari uji sensitifitas kemudian dilakukan *Polymerase Chain Reaction* untuk menemukan adanya fragmen gen *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik ampisilin, siprofloksasin, gentamisin, kloramfenikol, dan trimetoprim. Hasil yang diperoleh dari PCR tersebut berupa pola pita DNA (*band DNA*). Amplifikasi pada penelitian ini menggunakan dua pasang primer yaitu primer *shv* dan *catA1*.

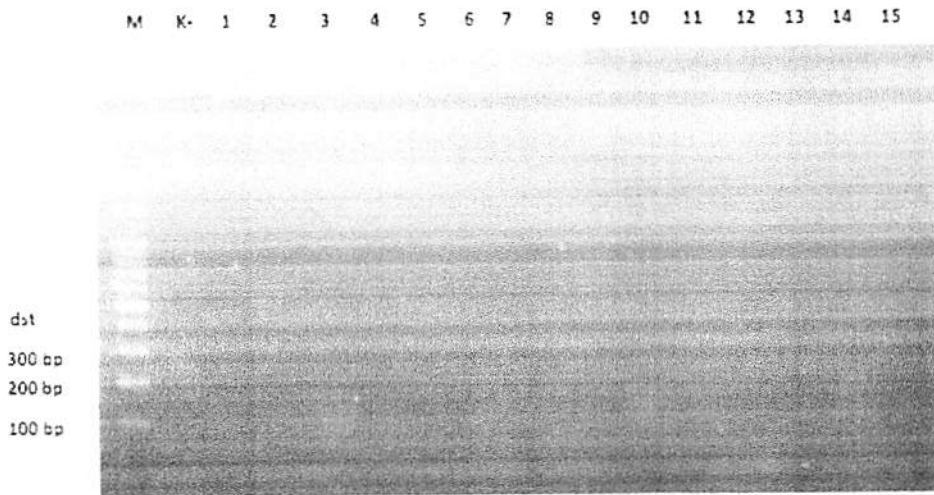


Gambar 5.5. Hasil Elektroforesis 2% produk PCR, gen *shv* ditunjukkan dengan adanya *band* pada 768 bp

Keterangan : M = Marker; K- = Kontrol Negatif; 1 = Sampel P3; 2 = Sampel P12; 3 = Sampel P13; 4 = Sampel KB9; 5 = Sampel KB11; 6 = Sampel KB18; 7 = Sampel W3; 8 = Sampel W7; 9 = Sampel W9; 10 = Sampel W13; 11 = Sampel KA6; 12 = Sampel KA10

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari 43 sampel yang positif terdapat bakteri *Escherichia coli* dan resisten terhadap *Ampicillin* terdapat 12 sampel yang positif menunjukkan adanya *band DNA* hasil amplifikasi primer *shv* dengan panjang 768 bp. Selanjutnya sampel bakteri *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Chloramphenicol* yang dirunning PCR sebanyak 15 sampel tidak terdapat sampel yang positif adanya *band DNA* dari primer *catA1* yang seharusnya

ditunjukkan dengan panjang 547 bp. Hasil elektroforesis produk PCR didapatkan seperti pada Gambar 5.5 dan Gambar 5.6.



Gambar 5.6. Hasil Elektroforesis 2% produk PCR, gen *catA1* tidak ditunjukkan adanya band yang seharusnya ditunjukkan band pada 547 bp

Keterangan : M = Marker; K- = Kontrol Negatif; Sampel 1 = Pogot 3; 2 = Pogot 12; 3 = Pogot 13; 4 = Kebraon 9; 5 = Kebraon 11; 6 = Kebraon 15; 7 = Kebraon 16; 8 = Kebraon 18; 9 = Wonocolo 3; 10 = Wonocolo 7; 11 = Wonocolo 9; 12 = Wonocolo 13; 13 = Kaliwaron 6; 14 = Kaliwaron 10; 15 = Kaliwaron 18.

Pembahasan

Hasil dari elektroforesis produk *Polymerase Chain Reaction* menyatakan bahwa *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik ditunjukkan dengan adanya *band*. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel susu tersebut secara genotip terdapat bakteri *Escherichia coli* yang resisten terhadap suatu antibiotik.

Hasil dari amplifikasi primer *shv* yang memiliki ukuran 768 bp ditemukan 12 dari 12 sampel *Escherichia coli* yang resisten terhadap ampisilin. Sedangkan primer *catA1* tidak menunjukkan *band* hasil amplifikasi yang seharusnya ditunjukkan band pada 547 bp dari 15 sampel *Escherichia coli* yang resisten terhadap kloramfenikol. Mekanisme utama dari bakteri untuk bertahan hidup dalam keadaan kritis adalah dengan cara mutasi secara genetik, ekspresi dari suatu gen resistensi atau melalui gen yang memiliki determinan terhadap resistensi, dimana ketiga mekanisme ini dapat berada bersama-sama dalam suatu bakteri. Kebanyakan resistensi antibiotika terjadi akibat mutasi

atau transfer gen secara horizontal yang membawa sifat resisten dan terjadi mutasi secara acak, spontan dan tidak tergantung dari adanya suatu antibiotik (Yenny dan Herwana, 2007).

Mutasi genetik merupakan mutasi yang hanya terjadi dalam lingkup gen. Peristiwa yang terjadi pada mutasi gen adalah adanya perubahan urutan-urutan DNA yang terdiri dari penyisipan, penghapusan, dan substitusi. Penyisipan terjadi ketika satu atau lebih nukleotida baru ditambahkan dalam urutan DNA untuk gen. Penghapusan terjadi ketika satu atau lebih nukleotida dikeluarkan dari urutan DNA untuk gen. Sedangkan sebuah substitusi terjadi ketika sebuah nukleotida diganti dengan nukleotida yang berbeda (Schleif, 1993).

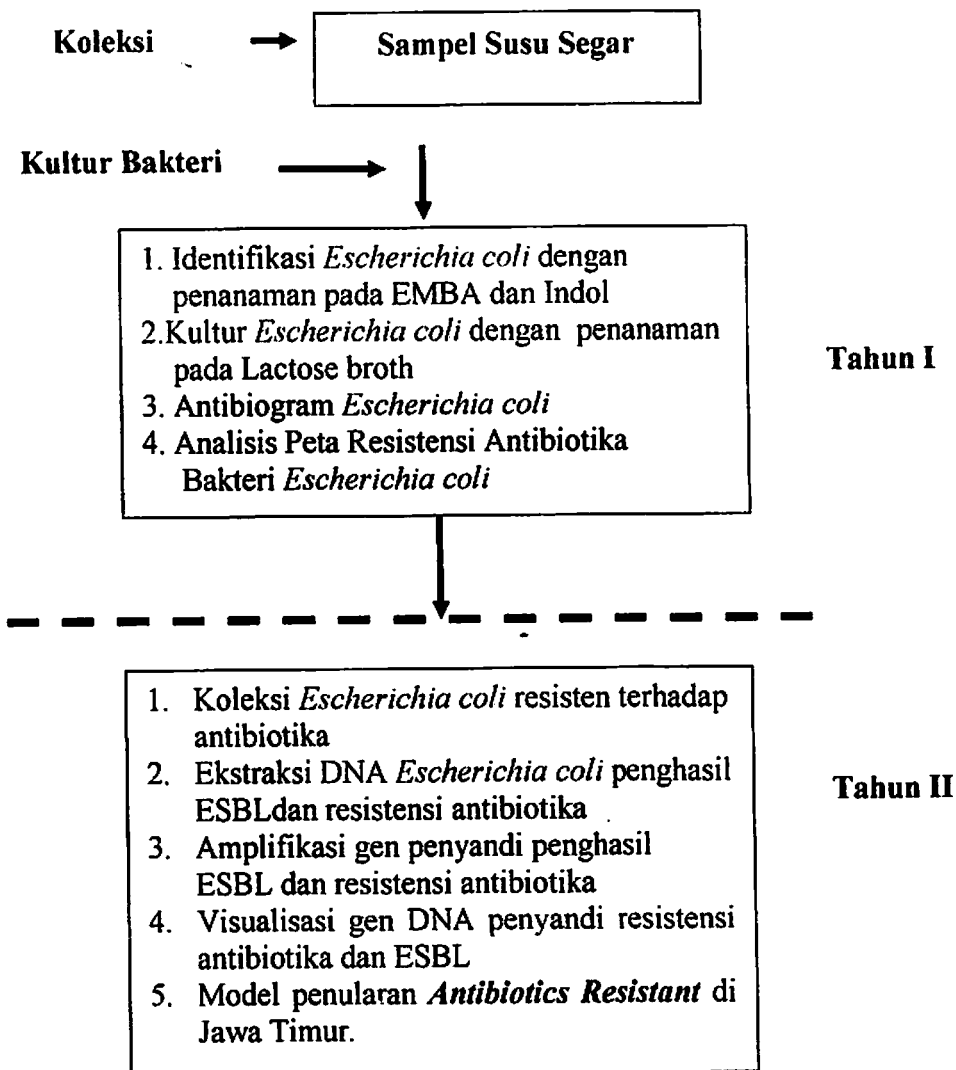
Proses dimana bahan genetik *Escherichia coli* dapat ditransfer dari satu bakteri ke bakteri lain adalah dengan mekanisme konjugasi. Mekanisme tersebut terjadi adanya pertukaran materi genetik antara dua bakteri akibat kontak fisik di antara keduanya melalui jembatan konjugasi. Jembatan tersebut berfungsi sebagai saluran yang mentransfer materi genetik dari satu bakteri (donor) ke bakteri lain (*recipient*). Proses konjugasi ini biasanya diinduksi oleh plasmid. Plasmid sebagai materi genetik ekstra-kromosomal, dapat membawa satu atau lebih gen penyandi resistensi terhadap antibiotik. Sampai saat ini, konjugasi dianggap sebagai salah satu mekanisme utama penyebaran gen penyandi resistensi pada bakteri (Sjahrurachman, 2011).

Pada pemeriksaan *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik kloramfenikol, tidak ditemukannya *band* dapat diasumsikan bahwa adanya gen resisten lain selain gen *catA1*. Menurut Momtaz *et al.*, (2012) bahwa resistensi *Escherichia coli* terhadap kloramfenikol dapat disandi oleh gen *catA1* dan *cmlA*.

Penelitian ini menggunakan gen *shv* dan *catA1* karena gen tersebut yang paling banyak menyandi gen resistensi *Escherichia coli* terhadap ampisilin dan kloramfenikol. Sejumlah peneliti melaporkan bahwa *shv* terdeteksi dua kali lebih sering dari *cmv* dengan ukuran 768 bp dan *catA1* terdeteksi dua kali lebih sering dari *cmlA* dengan ukuran 547 bp (Momtaz *et al.*, 2012).

BAB 6. INDIKATOR CAPAIAN TAHUNAN

Kerangka Penelitian



BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian untuk deteksi gen penyandi resisten antibiotik pada *Escherichia coli* yang diisolasi dari susu segar, adalah:

1. Sebanyak 43 sampel dari 70 sampel susu yang diambil dari peternakan sapi perah di Surabaya positif *Escherichia coli* resisten terhadap ampisilin. Terdapat 15 sampel dari 43 sampel susu yang positif *Escherichia coli* resisten terhadap antibiotik kloramfenikol. Tidak terdapat sampel yang resisten terhadap antibiotik siprofloksasin, gentamisin, dan trimetoprim.
2. Hasil dari elektroforesis produk *Polymerase Chain Reaction* menunjukkan bahwa sampel yang resisten terhadap ampisilin terdapat 12 *band* hasil amplifikasi primer *shv* dengan ukuran 768 bp, tetapi tidak menunjukkan *band* hasil amplifikasi primer *catA1* resisten terhadap kloramfenikol yang seharusnya ditunjukkan dengan ukuran 547 bp.
3. Sebanyak 128 sampel susu dari peternakan sapi perah di Jawa Timur, terdapat 94 sampel yang positif *Escherichia coli* dan semuanya resisten terhadap eritromisin, tetapi semuanya sensitif terhadap kloramfenikol.



DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M. R. and M. O. Moss. 2008. Food Microbiology 3rd Edition. Royal Society Of Chemistry. Cambridge. 121-130.
- Azizah, A. N. 2012. Aktivitas Biokimia Mikrorganisme. <http://www.scribd.com/doc/11731111> [30 September 2014].
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2009. Peraturan Kepala BPOM RI No. HK. 00.06.1.52.4011 Tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan. Jakarta.
- Badan Standardisasi Nasional. 2009. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan. Pusat standardisasi-LIPI. Jakarta.
- Bailey, W. R and E. G. Scott's. 2002. Diagnostic Microbiology 11th Edition. Mosby Inc. Saint Louis.
- Bettelheim, K.A. 1997. Escherichia coli O157 Outbreak in Japan: Lessons for Australia. Aust. Vet. J. 75(2):108.
- Bimantoro, S. 2014. Pengaruh Kondisi Hygiene Pemerah dan Sanitasi Kandang Terhadap Jumlah Cemaran Mikroba pada Susu Sapi di Peternakan Mojosongo Boyolali. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Brooks, G. F., J. S. Butel and S. A. Morse. 2004. Medical Microbiology 23rd Edition. The Mc Graw-Hill Companies, Inc. Singapore. 161-187.
- Buckle, K. A., R. A Edwards, G. H. Fleet dan M. Wooton. 1987. Ilmu Pangan. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 273.
- Cahyono, D., M. C. Padaga dan M. E. Sawitri. 2013. Kajian Kualitas Mikrobiologis (Total Plate Count (TPC), Enterobacteriaceae dan Staphylococcus aureus) Susu Sapi Segar di Kecamatan Krucil Kabupaten Probolinggo. Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak. 1-8.
- Chambers, H. F., 2007, Goodman dan Gilman Dasar Farmakologi Terapi Edisi 10, Jilid 2, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Clinical and Laboratory Standart Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard 11th Edition. Clinical and Laboratory Standard Institute. USA. Vol. 32 No. 1
- Costa, M. M., G. Drescher, F. Maboni, S. S. Weber, A. Schrank, M. H. Vainstein, I. S. Schrank, and A.-C. Vargas. 2010. Virulence Factors, Antimicrobial Resistance, and Plasmid content of *Escherichia coli* Isolated in Swine Commercial Farms. Med. Vet. Zootec Vol. 62 no. 1.
- Coyle, M. B. 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology. Washington.
- Dwiloka, B. 2003. Pengetahuan Bahan Olahan Hasil Ternak, SNI dan HACCP. Fakultas Peternakan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Fardiaz, S. 1993. Mikrobiologi Pangan I. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 159.
- Frazier, W. C and D. C Westhoff. 1988. Food Microbiology 4th Edition. Mc Graw-Hill. USA. 430-431.
- Frismana, R. A. 2014. Pencarian Sumber dan Karakteristik Gen Shiga Toxin dari Isolat *Escherichia coli* O157:H7 pada Susu Segar [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Gaffar, S. 2007. Penggunaan PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk Deteksi Retrovirus HTLV. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Golan, D. E., A. H. Tashijan and Amstrong. 2008. Principles of Pharmacology. The Pathophysiologic Basic of Drug Therapi 2nd Edition. 567-597.
- Gustani, E. 2009. Pengendalian Cemaran Mikroba pada Bahan Pangan Asal Ternak (Daging dan Susu) Mulai dari Peternakan sampai Dihidangkan. Jurnal Litbang Pertanian Vol. 28 No.3.

- Hadiwiyoto, S. 1994. Teori dan Prosedur Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya. Liberty. 2: 160-169.
- Holt, J. G., R. K. Noel, H. A. S. Peter, T. S. James, and T.W. Stanley. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition. Lippin Cott Williams and Wilkins. United State of America. 179-180.
- Iman, E. R. S., R. Ratnasari, H. E. Narumi, Suryanie, W. Tyasningsih dan S. Chusniati. 2011. Mikrobiologi Veteriner I. Airlangga University Press. Surabaya. 227-229.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg. 1995. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 20. Buku Kedokteran. EGC. Jakarta. 155-177.
- Jones, L. M. 1965. Veterinary Pharmacology and Therapeutics 3rd Edition. Iowa State University Press. USA. 456.
- Karsinah, H. M. Lucky, Suharto dan H. W. Mardiasuti. 1994. Mikrobiologi Kedokteran. Binarupa Aksara. Jakarta. 154-165.
- Kee, J. L. and E. R. Hayes. 1996. Farmakologi. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. 325-348.
- Livermore, D.M and D.F.J. Brown. 2001. Detection of β -lactamase-mediated resistance. Clin. Microbial. 8: 557 – 584.
- 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.
- Mansauda, K. L. R., Fatimawali dan N. Kojong. 2014. Analisis Cemaran Bakteri Coliform pada Saus Tomat Jajanan Bakso Tusuk yang Beredar di Manado. Jurnal Ilmiah Farmasi Vol. 3 No. 2.
- Meirawan, R. F. 2012. Profil Protein dan Resistensi Antibiotika Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Susu Sapi Perah di Kota Surabaya [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Melliawati, R. 2009. *Escherichia coli* dalam Kehidupan Manusia. BioTrends. Vol. 4 No. 1
- Momtaz, H., R. Farzan., E. Rahimi., F.S Dehkordi., and N. Souod. 2012. Research Article Molecular Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Ruminant and Donkey Raw Milk Samples and Traditional Dairy Products in Iran. The Scientific World Journal.
- Noor, S. M. dan M. Poeloengan. 2005. Pemakaian Antibiotika Pada Ternak dan Dampaknya pada Kesehatan Manusia. Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan. Bogor.
- Pelczar, J. M. and E. C. S. Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi. UI Press. Jakarta. 131-144.
- Peleg, A. Y. and D. C. Hooper. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. The New England Journal of Medicine. 362; 19.
- Poerba, Y. S. dan D. Martanti. 2008. Keragaman Genetik Berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA pada *Amorphopallus muelleri* Blume di Jawa. Jurnal Biodiversitas 9 (4) : 245 – 249.
- Pranawaty, R. N., I. D. Buwono dan E. Liviawaty. 2012. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional dan *Real Time PCR* untuk Deteksi *White spot Syndrome Virus* pada Kepiting. Jurnal Perikanan dan Kelautan. Vol. 3 No. 4.
- Pratt, W. B. 1990. Principles of drugs Action the Basis of Pharmacology 3th Edition. Philadelphia. Churchill Livingstone.
- Prawesthirini, S., H. P. Siswanto, A. T. S. Estoepangestie, M. H. Effendi, N. Harijani, G. C. de Vries, Budiarto, E. K. Sabdoningrum. 2009. Analisa Kualitas Susu, Daging dan Telur. Cetakan kelima. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Putra, M. A. A. 2012. Uji kepekaan bakteri terhadap antibiotika. Laboratorium Mikrobiologi. Fakultas farmasi universitas pancasila. Jakarta.
- Pyatov, V., I. Vrtkova, and A. Knoll. 2014. Detection of Aminoglycoside, Sulfonamide and Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Bovine Milk Sampels. Mendel University. Brno.

- Sarudji, S., S. Chusniati, E.R.S. Iman dan H.E. Narumi. 2011. *Petunjuk Praktikum Penyakit Infeksius I*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 19.
- Saleh, E. 2004. *Teknologi Pengolahan Susu Dan Hasil Ikutan Ternak*. Universitas Sumatra Utara Press. Sumatera Utara. 1-2.
- Schleif, R. 1993. *Genetics and Molecular Biology 2nd Edition*. The Johns Hopkins University Press. Maryland. 227-229.
- Siregar, S. 1995. *Sapi Perah: Jenis, Teknik Pemeliharaan, dan Analisis Usaha*. Penebar Swadaya. Jakarta. 30-32.
- Sjahrurachman, A. 2011. Cara Genetic untuk Menentukan Kepekaan Bakteri terhadap Antibiotik. *Bagian Mikrobiologi*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Vol. 38 No. 7
- Subronto. 1985. *Ilmu Penyakit Ternak I*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 346-347.
- Suwito, W. 2010. Bakteri yang Sering Mencemari Susu: Deteksi, Patogenesis, Epidemiologi, dan Cara Pengendaliannya. *Jurnal Litbang Pertanian*. Yogyakarta. Vol.29 No.3.
- Tan, T.H. dan K. Rahardja. 2002. *Obat-Obat Penting : Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya Edisi Kelima*. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta.
- Utami, E. R. 2012. Antibiotik, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *Sainstis*. Vol. 1 No. 1
- Walstra, P., J.T.M. Wouters & T. J. Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology 2nd Edition*. Taylor and Francis Group. Boca Raton.
- Wise R. 1999. A Review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agent can. *Resp. J.* 6 Suppl: 20A
- Wistreich, G. A. 2000. *Microbiology*. Glencoe Press. New York. 674-654.
- World Health Organization*. 2012. *The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance Options for Action*. World Health Organization. France.
- Yenny dan E. Herwana. 2007. Resistensi dari Bakteri Enterik : Aspek Global terhadap Antimikroba. *Universa Medicina*. Vol. 26 No. 1.



THE INDIAN VETERINARY JOURNAL

(The Official Organ of the Indian Veterinary Association)

Dr. S. SUKUMAR
MANAGING EDITOR

No.11, Chamiers Road, Nandanam
Chennai - 600 035, India.

Dated : October 22, 2018

ACCEPTANCE LETTER

The following article has been accepted and will be published in **MARCH, 2019** issue of Indian Veterinary Journal.

Article No.	Title	Author (s)
325/18	Prevalence of Pathogenic <i>Escherichia Coli</i> Isolated from Subclinical Mastitis in East Java Province, Indonesia.	Mustofa Helmi Effendi, Nenny Harijani, Budiarto, NjindiaPutriTriningtya, Wiwiek Tyasningsih, Hani Plumeriastuti

Sd/-

Managing Editor,
Indian Veterinary Journal

To,

Dr. Mustofa Helmi Effendi
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Medicine
Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia - 60115
E-mail : mheffendi@yahoo.com

THIS IS A COMPUTER GENERATED APPROVED ACCEPTANCE LETTER AND
REQUIRES NO SIGNATURE

PREVALENCE of PATHOGENIC
ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM SUBCLINICAL MASTITIS
IN EAST JAVA PROVINCE, INDONESIA

Mustofa Helmi Effendi¹⁾, Nenny Harijani¹⁾, Budiarto¹⁾, Nindia Putri Triningtya²⁾, Wiwiek Tyasningsih³⁾, and Hani Plumeriastuti⁴⁾

1) Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

2) Graduate Program in Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

3) Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

4) Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Indonesia

Corresponding author: Mustofa Helmi Effendi , Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia. Post Code: 60115. Telp :

+62315992785. Email : mheffendi@yahoo.com

Abstract

Escherichia coli is one of the food borne pathogens that results in major public health problems. The use of antimicrobials in food animals creates an important source of resistant bacteria and increases the risk of treatment failures. A study was conducted to isolate *E. coli* from raw milk samples and to determine the antibiogram pattern of *E. coli* isolates. A total of 150 milk samples were collected from East Java Province, Indonesia. Collected samples were tested with CMT for detection of subclinical mastitis and cultured on MacConkey agar and sub-cultured on Eosin Methylene agar. Several biochemical tests were performed for the confirmation of isolates. Antibiogram pattern of *E. coli* to antimicrobial agents was evaluated by the disk diffusion method using four antimicrobials. Results of the present study have revealed that out of the 150 samples

tested, 128 (85.33%) were found to be subclinical mastitis and contaminated with *E. coli* 94(74.33%). Antibiogram pattern assessed revealed a higher resistance against erythromycin (100%) and gentamicin (26%), followed by oxytetracycline (17.78%), and chloramphenicol (0%). Accordingly, results suggested a possibility of potential public health threat of *E. coli* strains originating from raw milk. The presence of antimicrobial resistance indicates alarming situation for timely designing of control and prevention methods to reduce its prevalence and antimicrobial resistance in food animals.

Key words: Antimicrobial resistance, raw milk, subclinical mastitis, *E. coli*

Introduction

Milk is one food that is very important in fulfilling the nutritional needs of the community. The nutritional composition of milk is very high and complete with perfect composition consisting of proteins, carbohydrates, fats, and minerals, thus making milk a good medium for the growth of microorganisms so potentially as a dangerous food (Harpini, 2008).

The presence of bacteria contamination in raw milk, in addition to endanger the health of consumers (Adam and Moss, 2008) can also be used as an indicator that the cow is infected with the disease (Kusumaningsih, 2013). In the management of dairy farming in some developing countries, mastitis is a major problem because it can lead to a decline in

milk production in large numbers (Oliver et al., 2005). Based on a study conducted by Kusumaningsih (2013), the discovery of pathogenic or commensal bacteria in antibiotic-resistant milk has important public health significance, which can lead to treatment failure in humans, increased hospitalization time, increased medical costs, and leaving the antibiotic residue on the product of livestock origin.

Based on the background, the researchers wanted to conduct research on resistance of some antibiotics to *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk in East Java and to prove the existence of certain resistant genes in *Escherichia coli* that have been resistant to some antibiotics by using PCR. Antibiotics used in this study were Erythromycin,

Oxytetracycline, Chloramphenicol, and Gentamicin. Detection of gene encoding antibiotic resistance in this study using *ereA* primers. The reason researchers used *ereA* primers refers to some references that provide information that there are already many isolates of *Escherichia coli* that are resistant to erythromycin and some international references that quite often find the gene encoding is *ereA*, but researchers have not found the reference to the Indonesian study.

Materials and methods

Raw milk sampling is done by non-sampling planned sampling (Alfiasari, 2012) that is easy to obtain by samples (convenience sampling).

The sample used in this research is milk taken from 4 dairy farms in East Java (Nongkojajar, Grati, Senduro and Batu) with sample size 150 samples. Milk sampling is done during milking. On each farm was taken a sample of milk as much as 10 ml taken aseptically from milk can after milking was completed (Effendi et al., 2017). Milk samples taken from cows that do not indicate symptoms of

swelling, udder hardening, pain, heat and redness even until there is a decrease in function on the udder and dairy farms that have poor sanitation. Each milk sample is put into a sterile plastic bag and stored in a thermos of ice (ice box).

Results

California Mastitis Test (CMT) is used to detect gel formations when comatic cells react with the reagents used. Positive reactions occur in the CMT paddle and are subjectively assessed (0, +1, +2, +3). The subjective value for positive 1 indicates the presence of clear, positive sediment 2 mixture immediately thickens and the sediment moves to the center of paddle and positive 3 looks much sediment and causes the surface to become convex (Setiawan, et al., 2012). CMT test results from cow milk samples taken from several farms in East Java can be seen in Table 1.

Based on CMT test results from cow milk samples taken in several farms in East Java there are 128 milk samples that showed positive results. This shows that as many as 85.33% of the 150 samples of cow milk in

East Java have a positive reaction on the CMT test.

Isolation and identification of *Escherichia coli* bacteria were taken from milk samples which had positive results on CMT test. The positive results of planting milk samples on Brilliant Green Bile Broth (BGBB) media are characterized by the discoloration from clear green to turbid green followed by gas formation. Based on table 1, there are 109 (85.16%) isolates that have positive results on planting in BGBB media. Positive isolates were then grown on Eosin Methylene Blue (EMBA) media and as many as 94 (86.24%) isolates had positive results in the presence of metallic green colonies and can be seen in Fig. 1. Further identification tests were indol

test followed by gram stain showing that there were 94 (100%) isolates having positive results.

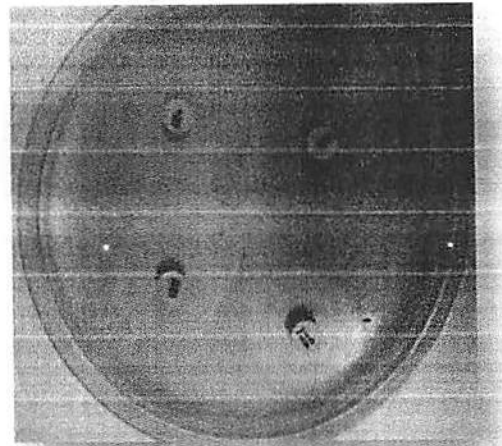
Escherichia coli isolates obtained from previous tests were used to test the sensitivity of 4 antibiotics erythromycin, oxytetracycline, gentamicin, and chloramphenicol and can be seen in Fig. 2. The reading of the results of the sensitivity test is done by measuring and comparing the clear zone formed with the standard zone according to Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI 2007). Table 2. showed the results of antibiotics sensitivity test on *E. coli*.

Table 1: Number of Subclinical mastitis and *E. coli* from several dairy farms

Name of farm	Number of samples	Subclinical mastitis	Positive <i>E. coli</i>
Nongkojajar	30	23	13
Grati	37	33	26
Batu	48	39	30
Senduro	35	32	25
Total	150	128	94

Table 2. The results of antibiotics sensitivity test on *E. coli*.

Name of farm	<i>E. coli</i>	Erythromycin	Oxytetracycline	Gentamicin	Chloramphenicol
Nongkojajar	13	R : 100%	R : 23,1%	R : 23,1%	R : 0%
		I : 0%	I : 23,1%	I : 46,1%	I : 0%
		S : 0%	S : 53,8%	S : 30,8%	S : 100%
Grati	26	R : 100%	R : 15,4%	R : 30,8%	R : 0%
		I : 0%	I : 19,2%	I : 46,1%	I : 0%
		S : 0%	S : 65,4%	S : 23,1%	S : 100%
Batu	30	R : 100%	R : 16,7%	R : 30%	R : 0%
		I : 0%	I : 10%	I : 36,8%	I : 0%
		S : 0%	S : 73,3%	S : 33,2%	S : 100%
Senduro	25	R : 100%	R : 16%	R : 20%	R : 0%
		I : 0%	I : 16%	I : 52%	I : 0%
		S : 0%	S : 68%	S : 28%	S : 100%

Fig. 1. *E. coli* shown green metallic on EMBAFig. 2. Antibiotics sensitivity test on *E. coli*

Discussion

total of 150 samples of cow's milk taken from 4 dairy farms in East Java were 128 samples of which had positive results on the CMT test. This indicates that cases of mastitis still occur in East Java. The advantages of using CMT include an inflammatory reaction of the udder can be known as early as possible, less treatment, easy to learn and can be done for multiple milk samples simultaneously (Karimuribo et al., 2006).

Mastitis can be divided into two types based on the causes of contagious mastitis and environmental mastitis (Piannechini et al., 2002). The most common contagious mastitis bacteria are *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Mycoplasma* (Subronto, 2003). Environmental mastitis is mostly caused by uniform bacteria such as *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* (Haftu et al., 2012). In this study, the bacteria that cause mastitis to look for was *Escherichia coli*.

Based on isolation and identification test of *Escherichia coli* bacteria from 128 positive milk samples in CMT test, there were 94 isolates of *Escherichia coli* positive sample. *Escherichia coli* can ferment lactose to acid and gas within 24-48 hours at a temperature of 30 ° C - 37 ° C. In addition *Escherichia coli* can also produce acids and gases from glucose, fructose, galactose, arabinose, xylose and mannitol. In EMBA media, colonies are metallic green with a black colony center. *Escherichia coli* is also capable of forming the indole of tryptophan which is indicated by the appearance of red color. These bacteria have tryptophanase enzymes that can hydrolyze tryptophan into pyruvate, ammonia, and indole (Leboffe and Pierce, 2011). Tryptophan is a component of amino acids commonly found in proteins, so this amino acid can easily be used by bacteria. In general, amino acids are used as cell components and energy sources. The formed indol will be red with the addition of Kovach or Erlich reagents containing amyl alcohol, so it can be said positive if this compound produces red color on the medium surface (Janie, 1989).

Escherichia coli bacteria can live on the floor of a cage, grass or water contaminated by livestock manure (Haftu et al., 2012). *E.coli* is aerobic and facultative anaerobic. The growth temperature of *E.coli* is 15-45 ° C with the optimum temperature of *E.coli* growth at 37.5 ° C (Chusniati, et al., 2011). *Escherichia coli* in its natural state can last several weeks to several months in water, feces, and garbage, but is not resistant to dry

ditions and to disinfectants. Some strains of *Escherichia coli* are also found to be present at cold temperatures below 0 ° C or in freezing for 6 months. These bacteria usually die at 60 ° C for 30 minutes, but there are some resistant strains (Madigan et al., 2003).

Stitis caused by *Escherichia coli* bacteria occurs during the rainy season (Giannechini, et al., 2002), where the cotton bed is dirty and damp (Radostits et al., 2007). *Escherichia coli* bacteria entering the nipple will infect the udder by releasing endotoxin (Radostits et al., 2007). This endotoxin then spreads to the microvascular wall of the alveoli and the interstitial tissue of the udder causing hyperemia, hemorrhage and edema (Quinn et al., 2002).

Antibiotics that want to be tested for sensitivity against *Escherichia coli* are erythromycin, oxytetracycline, gentamicin, and chloramphenicol. The results of antibiotic sensitivity test showed that 100% *Escherichia coli* isolates experienced resistance to erythromycin, while against chloramphenicol as much as 100% isolates were still sensitive. The data also showed that *Escherichia coli* isolates are also still sensitive to oxytetracycline. This is evident from 53.8% isolate N, 65.4% isolate G, 73.3% isolate B, and 68% isolate S which is still sensitive to oxytetracycline. The sensitivity test for gentamicin antibiotics showed intermediate results where N and G isolates had the same percentage of 46.1%, 36.8% for isolate B, and 52% for S. isolates. This indicates that *Escherichia coli* is still sensitive to chloramphenicol antibiotics and oxytetracycline, are less sensitive to gentamicin, and are resistant to erythromycin.

Escherichia coli bacterial resistance to erythromycin antibiotics shows that erythromycin loses its ability to effectively control or eradicate the growth of *Escherichia coli* bacteria, in other words bacteria are resistant and continue to proliferate despite adequate antibiotics for treatment. Non-genetic mechanisms of resistance can occur through excessive antibiotics, low doses continuously or irregularly (Effendi et al., 2017). While genetically, antibiotic resistance spreads through the bacterial population both vertically as new generations inherit genes that are resistant to antibiotics and horizontally when bacteria share or exchange materials with other bacteria. WHO (2012), the *ereA* gene encodes a macrolide enzyme-inactivating or enzymatic hydrolysis

activity of the macrolactone ring catalyzed by erythromycin esterase (ereA) resulting in drug inactivation leading to erythromycin resistance.

acknowledgements

This study was supported in part with the PTUPT Funds from Airlangga University, INDONESIA.

Conflict of Interest

The Authors declares that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Am, M. R. and M. O. Moss. 2008. Food Microbiology 3rd Edition. Royal Society Of Chemistry. Cambridge. 121-130.
- Asiasari. 2012. Metode Penulisan dan Penyajian Ilmiah. Departemen Ilmu Keluarga dan Konsumen, FEMA Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17th Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA. 27 (1): 44-51, 110-115, 162-163.
- Asniati, S., E.R.S Iman., R. Ratnasari., H.E. Naruni., Suryanie. W. Tyasningsih. 2011. Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner I. Airlangga University Press. Surabaya.
- Endi, MH., N. Harijani, and Budiarto. 2017. Profile antibiotics resistance on *Escherichia coli* isolated from raw milk in Surabaya dairy farms, Indonesia. *The Turkish Online Journal of Design, Art and Communication TOJDAC, Special Ed* : 1340-1344
- Annecchini, R., Concha , C., Rivero, R., Delucci, I. & Moreno López,, J. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43, 221-230.
- Aftu, R., Habtamu , T., Getachew, G. & Kalayou, S. 2012. Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 44, 1765-1771
- Surpini B. 2008. Upaya Menyongsong Industri Pengolahan dan Pemasaran Susu pada Peternakan Rakyat. Dalam: Prosiding Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas 2020. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan bekerja sama dengan Sekolah Tinggi Ilmu Ekonomi Keuangan dan Perbankan Indonesia". Jakarta
- Wardlaw, BSL. 1989. Uji Sanitasi Dalam Industri Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Murimuribo, E.D., Fitzpatrick, J.L., Bell, C.E., Swai, E.S., Kambarage, D.M., Ogden, N.H., Bryant, M.J. & French, N.P. 2006. Clinical and subclinical mastitis in smallholder dairy farms in Tanzania: Risk, intervention and knowledge transfer. *Preventive veterinary medicine* 74, 83-98
- Asumaningsih, A dan Aryianti, T. 2013. Cemaran Bakteri Patogenik Pada Susu Segar Dan Resistensinya Terhadap Antibiotik. Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor. Bogor.
- Bohne, M. J. and B. E. Pierce. 2011. A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory 4th Edition. Morton Publishing Company. USA. 144.

- ver, S.P., B.M. Jayarao and R.A. Almedia. 2005. Food Borne Pathogens in Milk and The Dairy Environment Food Safety and Public Helath Implications. *Food Borne Pathogens and Disease*. 2: 1115-1129.
- nn, P. J., B. K. Markey, F. C. Leonard, E. S. FitzPatrick, S. Fanning and P. J. Hartigan. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* 2nd Edition. Blackwell Publishing. Oxford. 286-287.
- ostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P. D. 2007. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Edinburgh: Saunders Elsevier
- awan H, Tisunuwati P, Winarso D. 2012. Kajian Sensitivitas dan Spesifisitas Reagen CMT, WST dan SFMT. Sebagai Bahan Uji Mastitis Subklinis di Peternakan Sapi Perah Rakyat, KUD Sumber Makmur Ngantang. Malang Program Studi Pendidikan Dokter Hewan. Universitas Brawijaya. Hal: 1-5
- ronto, I. Tjahjati. 2001. *Ilmu Penyakit Ternak II (Mamalia)*. Edisi Pertama Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 257-302,315-328.
- orld Health Organization (WHO). 2012. *The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance Options for Action*. World Health Organization. France.