

Skrening Resistensi Antibiotik Pada Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Usus Ayam Pedaging

Screening of Antibiotic Resistance on Lactic Acid Bacteria Isolated from Broiler's Intestine

Muhamad Ali^{1*}, Nurbaiti²⁾, Anwar Rosyidi¹⁾, dan Muhamad Ichsan³⁾

1) Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram Jl. Majapahit No. 62 Mataram, Indonesia, 83125.

2) Program Magister Manajemen Sumberdaya Peternakan Universitas Mataram Jl. Majapahit No. 62, Mataram, Indonesia, 83125;

3) Laboratorium Ternak Unggas Fakultas Peternakan Universitas Mataram Jl. Majapahit No. 62, Mataram, Indonesia, 83125;

*Penulis korespondensi, email: ali.molbiotech@gmail.com

ABSTRACT

Antibiotic use in poultry production is commonly performed as the feed additive for promoting the health and growth of the chicken. However, excessive use of antibiotics may lead to the emergence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, and pathogenic bacteria. In this research, screening of antibiotic resistance was assayed on lactic acid bacteria obtained from broiler intestine. Among the 14 lactic acid isolates, 2 (14%) isolates were found to be resistant to chloramphenicol. Resistance was also observed to ampicillin and kanamycin (7%). The result of this research indicated that the overuse and misuse of antibiotics in broiler farm tend to generate antibiotic resistance in broiler's intestine lactic acid bacteria. Therefore, some advice for safety measure of antibiotic application in poultry farmer is strongly necessary.

Keywords: antibiotic resistant microbe, broiler's intestine, lactic acid bacteria, poultry.

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik untuk mengatasi aneka penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme telah dilakukan sejak lebih dari 50 tahun yang lalu. Di bidang peternakan, antibiotik bahkan dipergunakan secara rutin sebagai "growth promoter" dalam bentuk *feed additive* bersama vitamin, mineral, dan komponen-komponen mikro lainnya. Namun, tingkat pengetahuan peternak yang belum memadai menyebabkan penggunaan antibiotik saat ini tidak teratur bahkan cenderung berlebihan sehingga dapat berperan menimbulkan berkembangnya bakteri patogen yang kebal (resisten) terhadap antibiotik (Obeng *et al.*, 2011).

Resistensi antibiotik merupakan suatu kemampuan bakteri atau mikroba lainnya untuk menahan efek suatu antibiotik. Resistensi antibiotik dapat terjadi karena penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan terus menerus sehingga mendorong berkembangnya bakteri yang kebal terhadap antibiotik. Madden (2009) melaporkan bahwa resistensi antibiotik meningkat secara nyata akibat kesalahan maupun kelebihan penggunaan antibiotik. Lebih lanjut dijelaskan bahwa kesalahan dan kelebihan penggunaan antibiotik tersebut dapat menimbulkan 2 (dua) hal, yaitu tekanan seleksi terhadap bakteri penerima antibiotik guna menghasilkan senyawa-senyawa yang dapat dipergunakan untuk bertahan hidup melawan antibiotik. Selain itu, adaptasi alami akan terjadi pada bakteri penerima yang akhirnya membuat bakteri tersebut

kebal serta menurunkan sifat kebal terhadap antibiotik tertentu kepada keturunannya.

Scott (2002) melaporkan munculnya gen resisten terhadap antibiotik pada bakteri yang diisolasi dari berbagai sumber. Penemuan ini sangat mengkhawatirkan karena Schjorring dan Krogh (2011) menemukan bahwa gen resisten tersebut dapat ditransfer secara *in vivo* dari bakteri patogen yang resisten antibiotik ke flora normal yang hidup dan berkembang di saluran pencernaan. Jika hal tersebut terjadi, maka munculnya mikroba resisten antibiotik akan berkembang dan meluas sehingga dapat menjadi ancaman serius terhadap kesehatan manusia terutama ketika kondisi kesehatan menurun dan sistem imun yang tidak berfungsi dengan baik.

Di sisi lain, penggunaan beberapa bakteri asam laktat akhir-akhir ini sebagai probiotik pada manusia maupun hewan cenderung meningkat (Fuller, 1992; Lee dan Salminen, 1995). Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa penggunaan probiotik telah memberikan keuntungan pada aneka ternak baik ayam broiler (Thah *et al.*, 2009; Loh *et al.*, 2010), ayam petelur (Choe *et al.*, 2012), maupun babi (Thu *et al.*, 2011). Menurut Fuller (1992) maupun Lee dan Salminen (1995), probiotik ini terdiri dari bakteri asam laktat, gram positif, anaerob, dan umumnya terdapat secara alami di dalam usus.

Penggunaan antibiotik yang tidak teratur dan berlebihan di satu sisi serta meningkatnya animo penggunaan probiotik di lain sisi dapat menimbulkan permasalahan serius jika tidak diatasi secara tepat. Hal ini disebabkan karena probiotik dapat berperan sebagai inang untuk menyebarkan gen resistensi antibiotik kepada mikroflora lainnya. Egervarn *et al.* (2009) menemukan munculnya resistensi antibiotik pada *Lactobacillus reuteri* dan *Lactobacillus plantarum*. Selain itu, resistensi pada antibiotik jenis vancomycin dilaporkan

terjadi pada *Lactobacilli*, *Pediococci*, dan *Leuconostoc* spp. Resistensi terhadap streptomisin, sulphadiazine, teicoplanin, bacitracin, cefoxitin, ciprofloxacin, asam fusidic, maupun vancomycin telah terjadi pada *Lactobacillus* (Danielsen dan Wind, 2003).

Semakin banyaknya bakteri asam laktat yang resisten terhadap aneka antibiotik akan dapat menimbulkan permasalahan serius. Untuk itu, negara-negara maju telah mulai melarang penggunaan antibiotik di bidang peternakan. Mengingat penggunaan antibiotik terutama pada ayam pedaging di Indonesia masih tinggi, maka pada penelitian ini akan dilakukan skrining adanya bakteri asam laktat yang resisten terhadap antibiotik.

MATERI DAN METODE

Isolasi dan konfirmasi bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat telah diisolasi menurut Rahayu dan Margino (1997) serta Nurbaiti *et al.* (2016). Isolasi tersebut dilakukan dari usus halus ayam pedaging (broiler) strain Arbor Acres yang diperoleh dari pedagang ayam potong di Pasar Narmada Kabupaten Lombok Barat dengan umur 35 hari sebanyak 6 ekor. Penggunaan media *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA) dimaksudkan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat secara selektif. Selain melalui penggunaan media selektif di atas, untuk memastikan bahwa bakteri-bakteri yang tumbuh adalah bakteri asam laktat, maka dilakukan beberapa uji lanjutan, diantaranya pengecatan Gram dan uji katalase menurut Nurbaiti *et al.* (2016). Bakteri-bakteri asam laktat murni yang telah diperoleh selanjutnya diuji resistensinya terhadap antibiotik.

Deteksi Resistensi terhadap Antibiotik

Untuk mengetahui ada tidaknya bakteri asam laktat yang resisten terhadap antibiotik, maka dilakukan uji pertumbuhan bakteri-bakteri tersebut pada

media yang ditetaskan dengan beberapa macam antibiotik. Adapun jenis antibiotik yang digunakan diantaranya ampisilin, kanamisin, dan klorampenikol. Uji ini dilakukan dengan menggunakan difusi sumuran, yaitu dengan cara 100 µl bakteri asam laktat (0,5 Mc Farland) diinokulasi secara merata pada media MRS agar dengan menggunakan sprider. Setelah itu, pada media yang telah diinokulasi dengan bakteri asam laktat tersebut dibuat sumuran menggunakan ujung tip bagian besar. Antibiotik kemudian dimasukkan pada sumuran tersebut masing-masing dengan konsentrasi 50 µg ampisilin, 25 µg kanamisin, dan 30 µg klorampenikol. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kondisi anaerob menggunakan an aerobic jar. Setelah waktu kultur tercapai, maka dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri di sekitar sumuran.

Analisis data

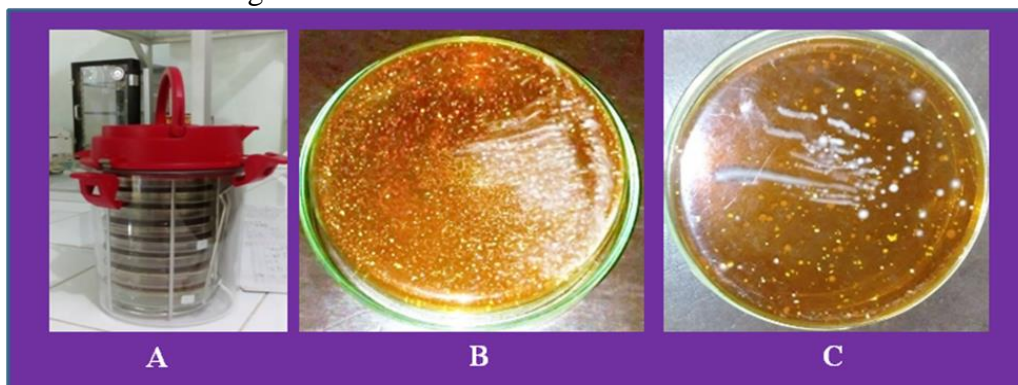
Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif kualitatif, yaitu dengan cara memvisualisasikan hasil penelitian menggunakan gambar dan tabel. Hasil visualisasi tersebut kemudian dibandingkan dan diamati perbedaan secara kualitatif. Adanya bakteri resisten terhadap antibiotik tertentu diketahui dari tumbuhnya bakteri secara merata pada media, termasuk di sekitar sumuran yang telah ditetaskan dengan antibiotik.

Sebaliknya, bakteri-bakteri yang tidak resisten ditunjukkan oleh terbentuknya *clearing zone* di sekitar sumuran berisi antibiotik, yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak dapat tumbuh di sekitar area sumuran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri Asam Laktat yang Diperoleh dari Usus Ayam Pedaging

Isolasi merupakan suatu metode untuk memisahkan mikroba tertentu dari populasi campuran, dilanjutkan dengan menumbuhkan mikroba tersebut pada media, sehingga memudahkan proses identifikasi selanjutnya terhadap mikroba yang telah diperoleh (Dwidjoseputro, 1998). Isolasi ini dilakukan dengan pengenceran isi usus ayam pedaging menggunakan bufer PBS dengan konsentrasi sampai 10^{-10} . Koloni-koloni yang tumbuh secara terpisah (koloni) tunggal selanjutnya dikultur ulang pada media MRS-A baru hingga mendapatkan koloni yang homogen dalam semua sifat penotif. Setelah berhasil mendapatkan koloni tersebut kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik. Gambar 1 menampilkan contoh hasil isolasi bakteri asam laktat dari usus ayam pedaging.



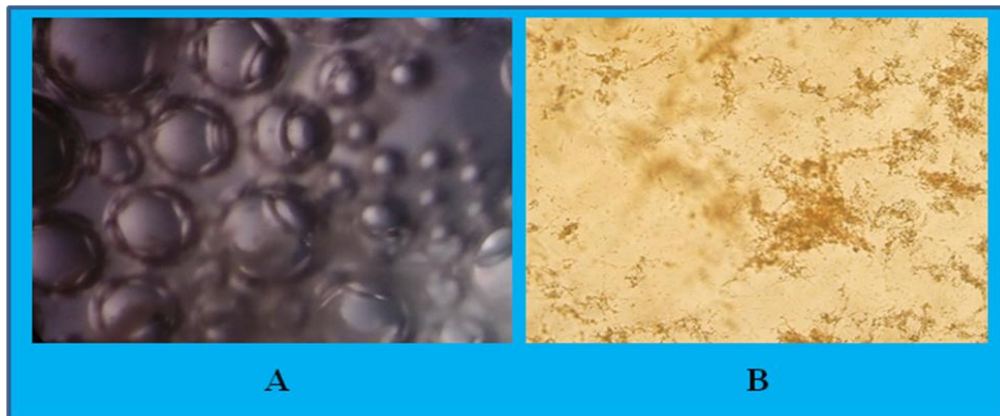
Gambar 1. Proses dan hasil isolasi bakteri asam laktat. A = *aerobic jar* yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat, B = hasil isolasi bakteri, C = hasil pemurnian bakteri asam laktat.

Shazali *et al.* (2014) menyatakan bahwa bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri anaerob dan Gram negatif yang menghasilkan asam laktat dalam proses fermentasi karbohidrat. Untuk itu, bioreaktor yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri tersebut adalah *anaerobic jar* yang dilengkapi dengan *anaerobic sussets*. Keberadaan *anaerobic sussets* tersebut berfungsi untuk mengikat O₂ selama proses kultur sehingga keadaan anaerob terjaga. Seperti yang ditampilkan pada gambar 1A, *anaerobic jar* yang dilengkapi dengan *anaerobic sussets* berhasil menumbuhkan bakteri asam laktat dalam jumlah banyak (Gambar 1B dan 1C). Karena *anaerobic sussets* berharga mahal, kondisi anaerob dapat juga diperoleh melalui inkubasi kultur menggunakan *anaerobic jar* yang dilengkapi lilin yang dinyalakan pada awal waktu kultur guna mencegah adanya O₂ di lokasi kultur.

Proses isolasi terhadap bakteri asam laktat berhasil mendapatkan 14 strain koloni yang masing-masing memiliki penotif yang seragam (Gambar 1C). Pada uji sifat morfologi bakteri diperoleh bentuk koloni yang bulat, bentuk penonjolan yang timbul, bentuk pinggir yang halus, warna koloni ada yang putih dan juga kuning telur. Uji sifat morfologi ini sangat penting untuk dilakukan sesuai dengan yang diungkapkan oleh Prabaningtyas (2003) yang diperkuat oleh Lay dan Hastowo (1992), uji sifat morfologi menyangkut sifat-sifat koloni seperti bentuk, ukuran, warna dan sebagainya yang memberi nilai diagnostik. Uji morfologi bakteri bermanfaat untuk menentukan ciri-ciri utama dari mikroorganisme yang perlu diketahui dalam mengkarakterisasi mikroba.

Pada pewarnaan Gram diperoleh hasil warna ungu, sehingga disimpulkan bahwa semua bakteri tersebut adalah Gram positif. Menurut Pelczar dan Chan (2008), bakteri Gram positif terlihat berwarna ungu karena dinding selnya mengikat kristal violet yang lebih kuat, sedangkan sel Gram negatif mengandung lebih banyak lipid sehingga pori-pori mudah membesar dan kristal violet mudah larut saat dicuci dengan alkohol.

Lebih lanjut, uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada sampel bakteri. Adanya enzim katalase pada bakteri asam laktat berperan untuk memecah H₂O₂ (hidrogen peroksida) menjadi H₂O dan O₂. Hasil uji katalase menunjukkan bahwa semua bakteri asam laktat yang diperoleh tidak menunjukkan adanya gelembung oksigen yang menjadi indikasi bahwa bakteri-bakteri tersebut adalah katalase negatif. Menurut Surono (2004), bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif dengan katalase negatif, tidak membentuk spora, anaerobik hingga aerofilik, dan membutuhkan nutrisi yang kompleks. Untuk menunjukkan bahwa proses dan tahapan uji katalase berlangsung sesuai dengan prosedur, telah digunakan bakteri *Escherichia coli* sebagai kontrol. Hasil uji katalase pada bakteri tersebut menunjukkan uji katalase positif yang ditandai dengan adanya gelembung-gelembung oksigen. Sesuai dengan pendapat Prasetyo *et al.*, (2011), uji katalase positif yang ditandai dengan terbentuknya banyak gelembung-gelembung oksigen. Gambar 2 menampilkan contoh hasil uji katalase negatif dan positif.



Gambar 2. Hasil Uji katalase (A) positif sebagai kontrol dan (b) negative pada bakteri asam laktat hasil isolasi.

Selain katalase negatif, isolat bakteri yang diperoleh juga tumbuh pada pH asam, kondisi anaerob, dan pada suhu 37°C sehingga semakin menguatkan dugaan bahwa bakteri yang diperoleh adalah bakteri asam laktat. Surono (2004) menjelaskan bahwa bakteri asam laktat merupakan spesies bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk asam laktat dari metabolisme karbohidrat dan tumbuh pada pH rendah.

Resistensi Bakteri Asam Laktat Terhadap Antibiotik

Penggunaan antibiotik di bidang peternakan saat ini sudah umum dilakukan, terutama pada ternak ayam broiler yang dipelihara dalam jumlah besar dan dengan cara intensif. Antibiotik tersebut digunakan sebagai obat dari penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen. Penggunaan antibiotik yang dilakukan secara terus menerus pada ternak dapat menyebabkan berkembangnya mikroorganisme yang kebal terhadap antibiotik.

Pada penelitian ini, uji resistensi yang digunakan adalah dengan cara difusi

agar yaitu dengan membuat sumuran pada media agar. Apabila terbentuk suatu zona bening di sekitar sumuran yang telah diberikan antibiotik berarti pertumbuhan bakteri terhambat atau bakteri tidak kebal terhadap antibiotik tersebut. Akan tetapi apabila tidak ada zona hambat yang terbentuk (bakteri dapat tumbuh di sekitar sumuran) berarti bakteri tersebut resisten atau kebal terhadap antibiotik yang diberikan. Wattimena (1981), mengungkapkan bakteri akan terhambat pertumbuhannya dengan pengamatan berupa lingkaran atau zona di sekeliling pencadang.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa, dari 14 isolat bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi, terdapat 2 isolat yang resisten terhadap antibiotik. Diantara kedua isolate tersebut. Terdapat 1 isolat resisten terhadap klorampenikol, sedangkan 1 isolat resisten terhadap ampisilin, kanamisin, dan klorampenikol. Untuk itu, kedua isolat tersebut diduga memiliki spesies yang berbeda akan tetapi dari genus yang sama yaitu *Lactobacillus*. Surono (2004) mengungkapkan bahwa resistensi probiotik spesifik terhadap strain atau spesies tertentu. Hasil uji resistensi antibiotik ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji resistensi bakteri asam laktat terhadap antibiotik

Dugaan Genus	Resisten Terhadap Antibiotik		
	Ampisilin	Kanamisin	Klorampenikol
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten

<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Resisten	Resisten	Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Leuconostoc</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Leuconostoc</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten
<i>Lactobacillus</i>	Tidak Resisten	Tidak Resisten	Tidak Resisten

Resistensi tersebut dapat disebabkan oleh suatu faktor yang sudah ada pada mikroorganisme itu sebelumnya atau mungkin juga faktor itu diperoleh kemudian. Sebagai contoh, resistensi terhadap penisilin pada suatu organisme dapat disebabkan oleh produksi penisilinase, suatu enzim yang menginaktifkan penisilin.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Sebanyak 14 isolat bakteri asam laktat berhasil diisolasi dari 6 usus ayam broiler yang diperjual belikan di pasar Narmada.
2. Bentuk-bentuk dari bakteri asam laktat tersebut adalah 12 isolat berbentuk *Lactobacillus* dan 2 isolat berbentuk *Leuconostoc*.
3. Hasil penelitian ini menemukan 2 bakteri asam laktat yang resisten terhadap antibiotik. Satu bakteri asam laktat resisten terhadap klorampenikol dan 1 bakteri asam laktat resisten terhadap ampicilin, kanamisin, dan klorampenikol.

DAFTAR PUSTAKA

Choe DW., Loh TC., Foo HL., Hair-Bejo M., Awis QS. 2012. Egg production, faecal pH and microbial population, small intestine morphology, and plasma and yolk cholesterol in

laying hens given liquid metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains. *British Poultry Science*. 53: 106-115.

Danielsen M., and A. Wind. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. 82: 1-11.

Dwidjoseputro. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Surabaya.

Egervarn M., S. Roos and H. Lindmark. 2009. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal Applied Microbiology*. 17:1658-1668.

Fuller, R. 1992 . History and development of probiotics. In: *Probiotics, The Scientific Basis*. Ed. London Pp 1-7.

Lay BW, and S. Hastowo. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Press. Jakarta.

Lee, Y. K., and S.Salminen.1995. The coming age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 6:241 – 245.

Loh TC., NT.Thanh, HL. Foo, M. Hair-Bejo, and BK. Azhar. 2010. Feeding of different levels of metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faecal microflora, volatile fatty acids and villi height in broiler. *Animal Science Journal*. 81: 205-214.

Madden D. 2009. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* A practical investigation of bacteria conjugation.

- National center for Biotechnology Education (NCBE): the University of Reading.
- Nurbaiti, A. Rosyidi dan M. Ali. 2016. Skrening bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus ayam broiler sebagai kandidat probiotik untuk unggas. *JITPI*, 2:144-149.
- Obeng AS., H.Rickard, O. Ndi O, M. Sexton, and M. Barton. 2011. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the feces of intensively farmed and free range poultry. *Veterinary Microbiology*. 6: 21.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Prabaningtyas S. 2003. *Karakteristik Bakteri Koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Malang*, 8.
- Prasetyo J, K. Naruse, T. Kato, C. Boonchird, S. Harashima, and E. Park. 2011. Bio-conversion paper scudge to biofuel by simultaneous saccharification and fermentation using a cellulase of paper sludge origin and thermotolerant *saccharomyces cerevisiae* TJ 14. *Biotechnol Biofuels* 4 (1):35.
- Rahayu, E.S. dan Margino. 1997. *Bakteri Asam Laktat Isolasi dan Identifikasi*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Schjorring S., and KA Krogfelt. 2011. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfers in the gut. *International Journal of Microbiology*.
Doi:10.1155/2011/3/312956.
- Scott KP. 2002. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract *Cell Mol. Life Science*. 59:2071-2082.
- Shazali N., HL. Foo, TC. Loh, DW Choe, and RA Rahim. 2014. Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the feces of broiler chicken in Malaysia. *Gut Pathogen*, 6: 1.
- Surono, I. S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia (YAPMMI). TRICK. Jakarta.
- Thanh NT., TC. Loh, HL. Foo, M. Hair-Bejo, and BK. Azhar. 2009. Effects of feeding metabolit combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faecal microbial population, small intestine villus height and faecal volatile fatty acids in broilers. *British Poultry Science*. 50: 298-306.
- Thu TV., TC. Loh, HL. Foo, H. Yaakub, and M. Hair-Bejo. 2011. Effects of liquid metabolite combination produced by *lactobacillus plantarum* on growth performance, feces characteristics, intestinal morphology and diarrhea incidence in postweaning piglets. *Tropical Animal Health Production*. 43:69-75.
- Wattimena, J.R. 1981. *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.