

Uji Resistansi Antibiotik Bakteri *Vibrio Parahaemolyticus* dari Udang Putih (*Litopaneus Vannamei*) Serta Identifikasi Gen Penyandi Resistan Ampisilin

(Antibiotic Resistance Testing of Bacteria *Vibrio Parahaemolyticus* from White Shrimp (*Litopaneus Vannamei*) and Identification of Ampicillin-Resistant Gene)

Vetty Ramadhaniah^{1*}, Agustin Indrawati², Bayu Febram Prasetyo³

¹ Pascasarjana Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB, Bogor

² Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB, Bogor

³ Sub Divisi Farmasi Veteriner, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB, Bogor

*Penulis untuk korespondensi: vetty.paderi@gmail.com

Diterima: 4 Maret 2024, Disetujui: 18 Juli 2024

ABSTRAK

Penyakit vibriosis pada udang putih (*Litopaneus vannamei*) sangat ditakuti oleh pembudidaya pada tahun 2009 karena diduga dapat menimbulkan *early mortality syndrome* (EMS). Penyakit ini menyebabkan kematian massal pada usia muda. Umumnya vibriosis pada udang dicegah dan diobati dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan resistansi multi-antibiotik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat resistansi antibiotik terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* di udang putih dan mengidentifikasi keberadaan gen resistan terhadap ampisilin. Isolat bakteri *V. parahaemolyticus* diuji resistansi terhadap antibiotik ampisilin, oksitetrasiklin, kloramfenikol, enrofloxasin, dan eritromisin. Penelitian ini dilakukan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer dengan tabel *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Hasil uji resistansi menunjukkan bahwa 30 isolat *V. parahemolyticus* sensitif terhadap enrofloxacin (94%), dan kloramfenikol (97%). Adapun hasil uji terhadap ampisilin menunjukkan adanya resistan (77%). Bakteri yang resistan terhadap ampisilin diuji terhadap keberadaan gen yang mengkode protein BlaTEM yaitu dengan hasil persentase 100% (dari 6 sampel) pada ampikon 516 bp. Dapat disimpulkan bahwa isolat *V. parahaemolyticus* resistan terhadap ampisilin terhadap gen BlaTEM.

Kata kunci: *Vibrio parahaemolyticus*, resistansi antibiotik, gen penyandi

ABSTRACT

Vibriosis in white shrimp (*Litopaneus vannamei*) became a great fear among fish farmers in 2009 because it was thought to cause EMS (Early Mortality Syndrome). This disease causes mass mortality at a young age. Generally, vibriosis in shrimp is prevented and treated with antibiotics. Improper use of antibiotics can lead to multiple antibiotic resistance. This study was conducted to determine the level of antibiotic resistance to *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in white shrimp and to identify the presence of the ampicillin resistance gene. *Vibrio parahaemolyticus* bacterial isolates were tested for resistance to the antibiotics ampicillin, oxytetracycline, chloramphenicol, enrofloxacin, and erythromycin. This study was performed using the Kirby-Bauer disc diffusion method with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tables. Resistance testing showed that 30 isolates of *V. parahemolyticus* were sensitive to enrofloxacin (94%), and chloramphenicol (97%). The results for ampicillin showed resistance (77%). Ampicillin-resistant strains showed the presence of genes encoding BlaTEM protein resistance in 100% (out of 6 samples) of 516 bp amplicons. It can be concluded that the *V. parahaemolyticus* isolates are ampicillin resistant to the BlaTEM gene.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, antibiotic resistance, coding gene

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Early mortality syndrome atau EMS menyebabkan kematian yang tinggi atau massal di udang pada DOC (*day of culture*) awal, bahkan sebelum DOC 30. Pertama kali penyakit ini terjadi di Tiongkok (2009) dan menyebar ke berbagai daerah di Asia (Zorriehzahra et al., 2015). Kasus ini mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup besar dalam bisnis perudangan global. Indonesia merupakan suatu negara yang belum pernah melaporkan secara resmi kasus EMS. Namun, kita harus hati-hati terhadap kemungkinan munculnya wabah penyakit tersebut.

Kejadian EMS di udang putih ditandai dengan gejala *acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) yang diduga karena keberadaan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Bakteri *V. parahaemolyticus* yang termasuk dalam famili *Vibrionaceae* pada udang umumnya menunjukkan gejala *white feces syndrome/diseases* (WFS/WFD) yang ditandai dengan kotoran putih yang mengambang di permukaan tambak (Kumar et al., 2020).

Vibrio parahaemolyticus merupakan bakteri yang tumbuh secara alami di perairan laut, pantai, muara, dan budidaya udang. Keberadaan *V. Parahaemolyticus* di wilayah laut telah tercatat di beberapa wilayah, antara lain Indonesia, Jepang, Korea Selatan, Thailand, India, serta negara-negara Eropa dan Amerika (Ferretti et al., 2016).

Tindakan pencegahan dan pengobatan penyakit *vibriosis* pada umumnya dengan menggunakan antibiotik. Pemberian antibiotik sebagai antibakteri dapat dilakukan dengan cara oral, perendaman atau penyuntikan langsung pada ikan dan udang. Berdasarkan Undang - Undang Perikanan No.31 Tahun 2004 pasal 8 ayat 1, penggunaan bahan kimia (antibiotik) dalam budidaya akuatik dilarang terutama pada saat mengaplikasikan Cara Budidaya yang Baik (CBB).

Saat ini bakteri di udang mulai menunjukkan kebal atau resistan dengan berbagai macam antibiotik/ *multiple antibiotic resistance* (MAR), sehingga penyakit sangat sulit untuk disembuhkan dan bisa berujung pada kematian. MAR menyebabkan obat tidak bisa mengatasi infeksi bakteri. Hal ini dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang signifikan bagi pembudidaya. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat, tidak terkontrol, dan terus menerus dalam budidaya udang telah mengakibatkan berkembangnya strain bakteri *Vibrio* yang resistan (Rocha et al., 2016; Kusmarwati dkk, 2017; Sarjito, 2016).

Kusmarwati dkk (2017) melaporkan bahwa

antibiotik tertentu yang biasa digunakan pada budidaya udang di Indonesia dapat membuat bakteri *Vibrio* menjadi resistan. Beberapa strain bakteri *Vibrio* yang diisolasi dari tambak komersial di Pantai Utara menunjukkan resistansi terhadap antibiotik yaitu eritromisin, amoksilin-asam klavulanat dan nitrofurantion.

Saat ini *multiple antibiotic resistance* (MAR) pada bakteri menjadi perhatian besar dan masalah serius yang mengancam sistem kesehatan modern (WHO 2014). Resistansi antibiotik menyebabkan DNA bakteri menghasilkan protein anti-antibiotika. Bakteri yang mempunyai protein anti antibiotika akan menurunkan efektifitas antibiotik, sehingga bakteri tetap dapat tumbuh saat diberikan antibiotik. MAR dapat terjadi karena beberapa penyebab, seperti adanya mutasi DNA atau transfer DNA antar bakteri, modifikasi *reseptor site* dan perubahan membran bakteri (Arber, 2014). Menurut EFSA & ECDC (2009); Prestinaci et al. (2015) terdapat penyebaran gen (DNA) resistan di manusia seperti bakteri penyebab tifus yaitu *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

Keberadaan resistansi beberapa antibiotik di *V. parahemolyticus* perlu mendapatkan perhatian dalam menjaga *one health system* dan sistem budidaya yang berkelanjutan. Pengujian resistansi dengan metode Kirby-Bauer dapat menjadi preventif maupun skrining terhadap isolat yang berasal dari lapangan.

Penelitian bertujuan untuk menguji resistansi antibiotik pada bakteri *Vibrio parahemolyticus* yang di isolasi dari udang putih (*Litopenaeus vannamei*) dan mengetahui apakah bakteri resistan tersebut membawa gen pengkode resistansi.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian identifikasi bakteri dan uji sensitivitas adalah sarung tangan, masker, inkubator 30- 37°C, tabung reaksi steril, ose, pipet tetes, cawan petri steril, pinset, pembakar bunsen, kaca objek, kaca penutup, kertas saring, mikroskop, coolbox, tabung Durham, vortex mixer, lemari pendingin, cotton swab, dan penggaris. Alat yang digunakan selain itu adalah mikropipet 10 µl, mikropipet 200 µl, mikropipet 1000 µl, mikrotips 10 µl, mikrotips 200 µl, mikrotips 1000 µl, mikrotube 0,2 dan 1,5 ml, paraffin film, pipet volumetrik 10 ml, gelas ukur, erlenmeyer, timbangan analitik, vortex, sentrifuse, mesin amplifikasi, mesin elektroforesis dan mesin UV reader

Bahan yang digunakan pada penelitian identifikasi bakteri dan uji sensitivitas adalah alkohol 70%, aseton alkohol, akuades steril, desinfektan, TCBS, TSA, TSB,

Chrome agar, minyak emersi, xilol, akuades, crystal violet, lugol, safranin, H₂O₂ 3%, Mueller-Hinton agar (MHA), NaCl, dan kertas cakram antibiotik (ampisilin, oksitetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin dan enrofloksasin), kertas cakram blank, media Voges-proskauer (VP), media urea, media gula sukrosa dan manitol, media indol, alkohol 95%, DMSO dan KOH 40%. Adapun bahan PCR yang digunakan adalah reagen DTAB, reagen CTAB, klorofom, isopropanol, etanol, Dimetil Sufoksida, agarose dan reagen amplifikasi (master mix, primer reverse, primer forward dan nucleas free water), TAE buffer dan floresafe dNA stain.

Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dari bulan Januari sampai Juni 2022. Identifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan pengujian resistansi antibiotik serta keberadaan gen penyandi resistansi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Medik, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University.

Isolat *Vibrio Parahaemolyticus*

Identifikasi bakteri *V. parahaemolyticus* dengan uji fenotif dan genotif. Uji Fenotif dengan pewarnaan gram (fenotif mikroskopik) dan biokimia. Uji biokimia berupa uji katalase, fermentasi maltosa dan sukrosa, indol, Voges-Pausker, urease dan fermentasi TSIA. Bakteri diisolasi dari organ *stomach*, *hepatopancreas* atau *midgut* dari udang putih pada media *tryptic soy broth* (TSB), media *thiosulfate citric bile salt sucrose* (TCBS). Pada media TCBS terlihat adanya pertumbuhan koloni hijau dan di lanjutkan pada media CHROMagar dengan pertumbuhan koloni *mauve*.

Uji Resistansi Antibiotik

Uji resistansi bakteri terhadap antibiotik dilakukan dengan menggunakan metode *Kirby-Bauer*. Penggunaan kertas cakram (*paper disc*) dengan 5 jenis antibiotik yang diujikan yaitu ampisilin, oksitetrasiklin,

enrofloksasin, eritromisin, dan kloramfenikol. Perbandingan kontrol negatif menggunakan kertas cakram yang tidak mengandung antibiotik. Kertas cakram ditempatkan pada media *Mueller Hinton Agar* yang sebelumnya diinokulasi dengan bakteri *V. parahaemolyticus*, diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Tingkat sensitivitas bakteri terhadap antibiotik ditentukan berdasarkan besarnya zona hambat dari masing-masing antibiotik. Diameter zona hambat dibandingkan dengan tabel standar *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2018).

Deteksi Gen Resistansi

Deteksi gen penyandi resistansi dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis dan visualisasi. Ekstraksi gen bakteri *V. parahaemolyticus* dengan metode DTAB-CTAB IQ 2000. Amplifikasi dengan menggunakan gen penyandi beta laktamase (*bla*TEM, CTX-M dan SHV) dari Mytaq™ HS Red Mix (Bioline). *Primer amplification* 25 µl yang terdiri dari mastermix 12,5 µl, *primer reverse* 1 µl, *primer forward* 1 µl, *nuclease free water* 8.5 µl dan DNA bakteri 2 µl. Sekuen basa dan suhu annealing pada masing-masing gen penyandi pada Tabel 1. Hasil amplifikasi kemudian diproses lebih lanjut dengan elektroforesis pada agarose 4% dan *flourosence dye*. Visualisasi pita dilakukan menggunakan UV transluminator.

HASIL

Identifikasi Bakteri *Vibrio Parahaemolyticus*

Isolat bakteri diperoleh dari organ hepatopankreas, lambung (*stomach*) dan usus (*midgut*) udang putih (*Litopaneus vannamei*) yang dibudidayakan di beberapa tambak di Jawa Tengah dan Sumatera bagian selatan. Sampel yang diperoleh dimasukkan ke dalam media *tryptic soy broth* (TSB "Difco") dan diinkubasi pada suhu 30-37 °C selama 18 – 24 jam. Isolat dari media TSB selanjutnya ditanam ke media spesifik *thiosulphate citrate bile salt sucrose* (TCBS "Difco") dengan metode 4 kuadran.

Tabel 1 Primer oligonukleotida dan ampikon gen penyandi resistansi ampisilin (*bla*TEM, *bla*CTX-M dan *bla*SHV) serta suhu *annealing* yang digunakan

Target gen	Sekuen basa	Ampikon, suhu <i>annealing</i>
<i>bla</i> TEM	(F)5'-ATC AGC AAT AAA CCA GC -3' (R)5'-CCC CGA AGA ACG TTT TC -3'	516 bp, 54 °C
<i>bla</i> CTX-M	(F)ATG TGC AGY ACCAGT AAR GTKATGGC (R)TGG GTR AAR TARGTS ACC AGAAYCAGG GG	539 bp, 52°C
<i>bla</i> SHV	(F)TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC (R)GAT TTG CTG ATT TCG CTC CC	141 bp, 60°C

Pada media TCBS koloni bakteri yang tumbuh memiliki karakteristik bentuk bulat, berukuran kecil dengan diameter 2–5 mm, permukaan cembung, tepian halus, dan berwarna hijau (Gambar 1). Kemudian koloni bakteri yang menunjukkan warna hijau ditanam kembali ke media spesifik *Vibrio* CHROMagar dengan metode gores kuadran. Bakteri *V. parahaemolyticus* yang tumbuh setelah inkubasi berwarna ungu (*mauve*), berbentuk bulat dengan diameter 2–5 mm dan permukaannya cembung serta halus (Gambar 1).

Hasil isolat secara makroskopis di media TCBS dan CHROMagar diperoleh 55 (lima puluh lima) isolat teridentifikasi sebagai *Vibrio* dan teridentifikasi *V. parahaemolyticus* sebanyak 39 (tiga puluh sembilan) isolat.

Pengamatan secara mikroskopik dengan pewarnaan Gram *V. parahaemolyticus* memiliki karakteristik bentuk batang seperti koma, susunan berantai atau tunggal dan berwarna merah (Gambar 2). Pewarnaan Gram menggunakan pewarna gentian violet dan safranin. Pengamatan secara mikroskopik pada pembesaran 1.000 x dengan bantuan minyak imersi.

Hasil pengujian biokimia dari isolat *V. parahaemolyticus* menunjukkan hasil negatif pada uji gula sukrosa dan *Voges- Pausker*. Adapun uji fermentasi gula manitol, katalase, indol, dan urease menunjukkan hasil yang positif. Hasil uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) menunjukkan asam dan asam dengan perubahan warna media merah menjadi kuning. Hasil pengujian secara biokimia ini dapat mengidentifikasi *V.*

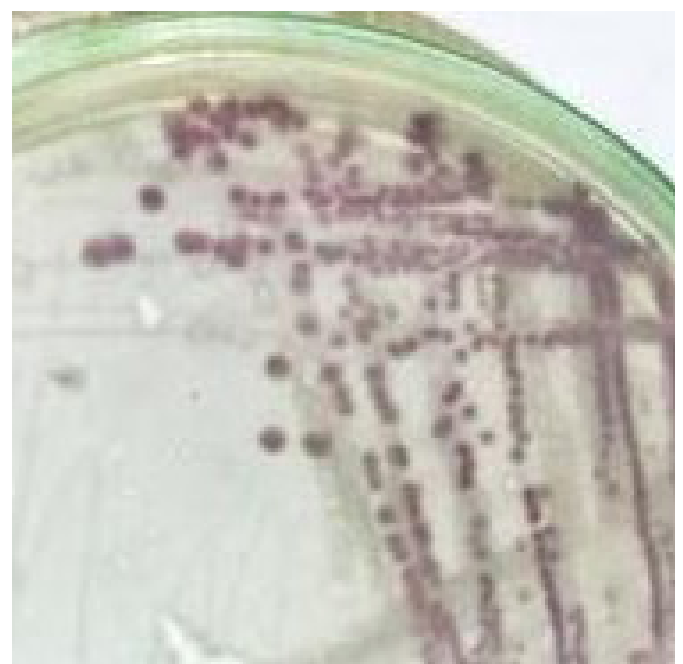
parahaemolyticus dari famili *Vibrionaceae* berdasarkan SNI nomor 01- 2332.5-2006.

Uji Resistansi Antibiotik

Seluruh isolat *Vibrio parahaemolyticus* diuji resistansi terhadap antibiotik dengan menggunakan metode difusi cakram menurut Kirby-Bauer. Antibiotik yang digunakan adalah ampisilin, kloramfenikol, enrofloksasin, eritromisin, dan oksitetrasiklin. Hasil uji resistansi dengan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri. Hasil pengukuran dilakukan perbandingan dengan tabel CLSI (2018). Diameter zona hambat yang terbentuk diinterpretasikan menjadi sensitif, intermediet, dan resistan.



Gambar 2 Foto *Vibrio parahaemolyticus* dengan pewarnaan gram (Pembesaran 1.000 x)



Gambar 1 Koloni Bakteri *V. parahaemolyticus* di media TCBS dan CHROM

Hasil uji resistansi dengan interpretasi sensitif terhadap antibiotik menunjukkan bahwa antibiotik dapat menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus*. Interpretasi resistan menunjukkan isolat tidak dapat dihambat pertumbuhannya oleh antibiotik yang digunakan.

Adapun hasil uji resistan antibiotik terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dengan ampisilin, oksitetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, dan enrofloksasin pada Tabel 2. Hasil menunjukkan zona hambat yang terbentuk oleh oksitetrasiklin, enrofloksasin dan kloramfenikol sensitif terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dengan persentase 77%, 94 %, dan 97 %. Sedangkan ampisilin menunjukan hasil yang resistan terbesar dengan persentase 77%. Hasil eritromisin terhadap *V. parahaemolyticus* menunjukkan interpretasi zona hambat yang hampir sama, sensitif 23%, intermediet 42 % dan resistan 35%.

Tabel 2 Persentase Berdasarkan Nilai Interpretasi Zona Hambat Antibiotik

Antibiotik	Sensitif	Intermediet	Resistan
Ampisilin	10%	13%	77%
Kloramfenikol	97%	0%	3%
Enrofloksasin	94%	6%	0%
Eritromisin	23%	42%	35%
Oksitetrasiklin	77%	10%	13%

Pada Tabel 3 dan Grafik 1 menunjukkan nilai diameter zona hambat yang terbentuk pada antibiotik ampisilin, eritromisin dan oksitetrasiklin menunjukkan diameter zona hambat yang luas dari 0 - 24, 0 - 35 dan 0 - 36. Adapun enrofloksasin menunjukkan zona hambat yang sempit pada 21 - 37. Hal ini menunjukkan kuatnya kemampuan enrofloksasin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* yang diterprekasikan sensitif berdasarkan CLSI (2018).

Tabel 3 Besar diameter Zona Hambat Antibiotik

Antibiotik	Diameter Zona Hambat (mm)		
	Maksimal	Minimal	Rata-Rata
Ampisilin	24	0	9,9
Kloramfenikol	40	11	28,3
Enrofloksasin	37	21	30,0
Eritromisin	35	0	17,4
Oksitetrasiklin	36	0	22,6

Uji penyandi gen resistan ampisilin

Bakteri *V. parahaemolyticus* yang resistan terhadap ampisilin di uji keberadaan gen penyandi beta laktamase. Uji beta laktamase dilakukan terhadap gen

blaTEM, CTX-M, dan SHV pada 6 sampel isolat yang resistan ampisilin. Pada uji gen blaTEM ditemukan isolat bakteri *V. parahaemolyticus* menunjukkan adanya gen penyandi blaTEM pada amplikon 516 bp pada Gambar 3. Hasil analisis molekuler gen penyandi resistan terhadap isolat bakteri *V. parahaemolyticus* menunjukkan adanya gen blaTEM yang ditunjukkan dengan pola pita DNA (Gambar 3).

Hasil deteksi gen CTX-M dan SHV tidak ditemukan di ke 6 isolat bakteri. Hasil uji CTX-M (Cefotaxime) pada amplikon 539 bp (Gambar 4). Gen SHV (Sulfdril variable) pada amplikon 141 bp (Gambar 5).

PEMBAHASAN

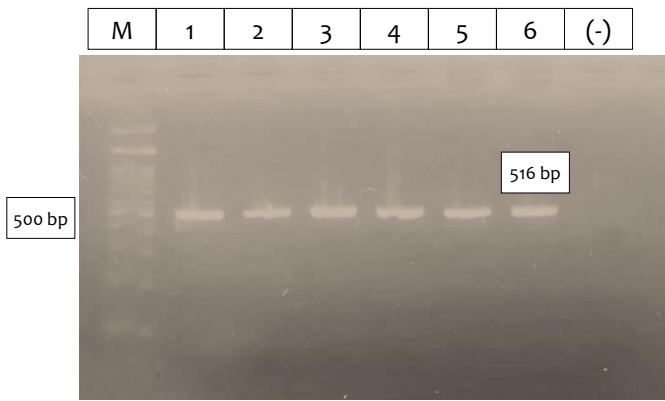
Identifikasi Bakteri *Vibrio Parahaemolyticus*

Vibrio adalah salah satu jenis bakteri yang tergolong dalam kelompok marine bacteria. Bakteri ini umumnya memiliki habitat alami di laut. Salah satu metode identifikasi *V. parahaemolyticus* secara fenotif makroskopik dengan menggunakan media TCBS dan CHROMagar. Selain itu identifikasi *V. parahaemolyticus* dilanjutkan dengan fenotif mikroskopik serta biokimiawi. Hasil identifikasi fenotif kemudian dikonfirmasi dengan uji genotif menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

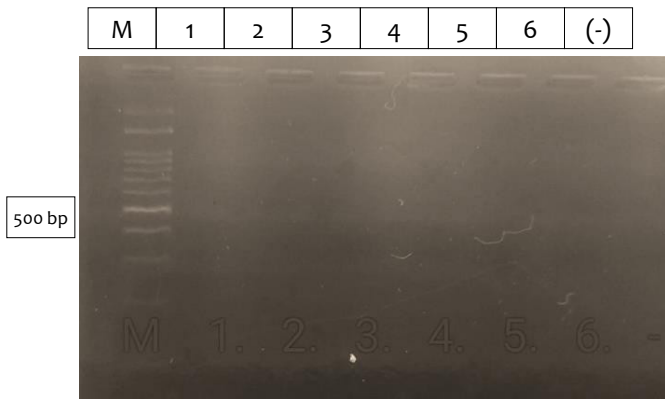
Media TCBS merupakan media isolasi selektif yang mengandung tiosulfat. Tiosulfat mampu menghambat bakteri lain untuk tumbuh, selain bakteri *Vibrio* (Ferretti et al., 2016). Koloni *V. parahaemolyticus* di media TCBS berwarna hijau karena ketidakmampuan bakteri untuk memfermentasikan gula sukrosa didalam media. Pada media spesifik CHROM agar koloni *V. Parahaemolyticus* berwarna ungu/ *mauve* karena substrat kromogenik beta galaktosida yang berbentuk gula di dalam media mengalami fermentasi (Ferretti et al., 2016).

Hasil positif uji katalase ditunjukkan dengan terbentuknya gas atau gelembung udara. Gas atau gelembung udara terbentuk karena adanya enzim katalase pada bakteri yang mampu mengubah H₂ dan O menjadi H₂O (oksigen). Uji indol menunjukkan positif, jika media pada daerah yang ditusuk terlihat adanya pertumbuhan bakteri menyebar. Penyebaran pertumbuhan menunjukkan bahwa bakteri memiliki flagela yang dapat bergerak atau motil. Pada uji fermentasi gula manitol menunjukkan hasil positif dengan perubahan warna dari media merah menjadi kuning. Fermentasi pada gula sukrosa negatif tanpa perubahan warna (merah).

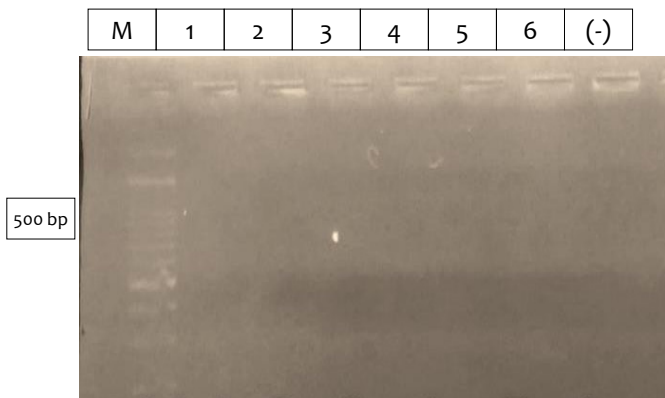
Hasil pengujian H₂S dan fermentasi gula dengan media TSIA menunjukkan hasil yang positif dengan perubahan warna media dari merah menjadi kuning yang berarti isolat mampu memfermentasi



Gambar 3 Foto hasil PCR *V. parahaemolyticus* pada gen BlaTem (M: marker DNA ladder, sampel 1-6 menunjukkan hasil positif (516 bp), (-) kontrol negatif



Gambar 4 Foto hasil PCR *V. Parahaemolyticus* pada gen CTX-M (M: marker DNA ladder, sampel 1-6 menunjukkan hasil negatif (866 bp), (-) kontrol negatif



Gambar 5 Foto hasil PCR *V. Parahaemolyticus* pada gen SHV (M: marker DNA ladder, sampel 1-6 menunjukkan hasil negatif (768 bp), (-) kontrol negatif

glukosa, laktosa dan sukrosa. Adapun H₂S dan gas tidak terbentuk. Hasil uji biokimia yang dihasilkan sesuai dengan penelitian (Ashofa et al., 2014) yang mengidentifikasi bakteri *Vibrio* pada kepiting dengan

hasil positif untuk oksidase, motilitas, indol, TSIA, katalase dan uji O/F yang bersifat fermentatif.

Uji Resistansi Antibiotik

Seluruh hasil isolat *Vibrio parahaemolyticus* diuji resistansi terhadap antibiotik dengan menggunakan metode difusi cakram menurut Kirby-Bauer. Hasil uji resistansi dengan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dan dibandingkan dengan tabel CLSI (2018). Kemudian diinterpretasikan menjadi sensitif, intermediet, dan resistan.

Adapun hasil zona hambat yang terbentuk adalah oksitetrasiklin, enrofloksasin dan kloramfenikol sensitif terhadap bakteri *V. Parahaemolyticus*. Sedangkan ampisilin menunjukkan hasil yang resistan terbesar. Menurut Kusmarwati dkk (2017) antibiotik yang mampu menghambat *V. parahaemolyticus* adalah siprofloksasin (88,89%), kloramfenikol (81,25%), dan doksisisiklin (33%).

Uji terhadap antibiotik pada beberapa jenis vibrio di tambak daerah Kendal didapatkan adanya resistan terhadap eritromisin, enrofloksasin dan oksitetrasiklin (Sarjito dkk, 2016). Antibiotik yang digunakan dengan cara yang tidak tepat atau tidak terkontrol serta terus menerus pada budidaya udang berkontribusi besar terhadap berkembangnya strain *Vibrio* yang resisten (Rocha et al., 2016; Kusmarwati dkk, 2017).

Pada Tabel 3 menunjukkan nilai diameter zona hambat yang terbentuk pada antibiotik ampisilin, eritromisin dan oksitetrasiklin menunjukkan diameter zona hambat yang luas dari 0 - 24, 0 - 35 dan 0 - 36. Adapun enrofloksasin menunjukkan zona hambat yang sempit pada 21 - 37. Hal ini menunjukkan kuatnya kemampuan enrofloksasin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* yang diinterpretasikan sensitif berdasarkan CLSI (2018).

Antibiotik merupakan pilihan umum yang biasa digunakan oleh petambak untuk pencegahan dan pengobatan saat udang terserang Vibriosis. Penggunaan antibiotik didasarkan pengalaman dan ketersediaan obat dipasaran, tidak berdasarkan hasil uji laboratorium sehingga hasil pengobatan umumnya tidak sesuai harapan. Ketidaktepatan penggunaan antibiotik dalam dosis dan aplikasi pemberian memicu terjadinya resistansi terhadap antibiotik dan adanya residu antibiotik di tubuh udang dan lingkungan.

Multiple antibiotic resistance (MAR) didefinisikan sebagai resistansi terhadap dua atau lebih obat maupun klasifikasi obat. Adapun kejadian *cross resistance* adalah resistansi suatu obat yang diikuti dengan obat lain yang belum pernah dipaparkan (Friedman, 2016). Menurut Sarjito dkk (2016) resistansi mikroorganisme terhadap antibiotik dapat terjadi

karena beberapa hal, antara lain :

1. Adanya mikroorganisme yang menghasilkan enzim yang dapat merusak aktivitas obat
2. Terjadinya perubahan kondisi permeabilitas dari mikroorganisme
3. Adanya modifikasi reseptor site pada bakteri sehingga menyebabkan afinitas obat berkurang
4. Terjadi mutasi dan transfer genetik.

Kejadian resistansi antibiotik di *Vibrio* dapat ditransfer (*cross resistance*) antar gen menurut Kusmarwati dkk (2017) yaitu di lokus atau bagian reseptor bakteri seperti plasmid, transposon dan integrons. Serta menurut Sarjito dkk (2016) resistan pada *Vibrio* juga dapat ditransfer dengan transport antar elemen seperti sulfidril (SXT). Multiplikasi atau perbanyak gen resistan terjadi karena adanya mutasi terhadap target obat atau bakteri yang membawa plasmid resistan. Hal ini menimbulkan seleksi acak terhadap target reseptor/lokus. Semakin banyak gen bakteri yang termultiplikasi resistan maka akan menekan pertumbuhan bakteri yang sensitif terhadap antibiotik (Miranda et al., 2013).

Uji penyandi gen resistan ampicilin

Hasil analisis molekuler gen penyandi resistan terhadap isolat bakteri *V. parahaemolyticus* menunjukkan adanya gen blaTEM yang ditunjukkan dengan pola pita DNA (Gambar 3). Gen blaTEM merupakan gen betalaktamase yang paling umum ditemukan. Gen ini pertama kali ditemukan di gram negatif seperti *Escherichia coli*.

Peningkatan frekuensi penggunaan ampicilin, maka gen ini juga dapat ditemukan di bakteri gram negatif lainnya seperti *V. parahaemolyticus*. Berdasarkan hasil penelitian Jeamsriponget al. (2020) ditemukannya gen blaTEM pada tiram dan lingkungan sekitar sebanyak 0.8 % dari 594 isolat *V. parahemolyticus*. Menurut hasil penelitian Khoiranidkk (2019) pada peternakan ayam di Bandung dan Purwakarta menunjukkan bakteri *E. coli* mempunyai empat gen resistan diantaranya qnr(B), tet(A), amp (C), dan tet(B) dan terdapat 2 - 4 gen resistansi terhadap ampicilin, asam nalidiksit, oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

Gen *Temoniera* (blaTEM) berada didalam plasmid atau kromosom DNA dengan lebih dari 90 tipe TEM. Gen ini mempermudah kemampuan gen *extended-spectrum β-lactamase* (ESBL) pindah dari satu organisme ke organisme yang lain, sehingga penyebaran resistansi sangat mudah terjadi antar strain bahkan antar spesies. Selain itu plasmid juga bertanggung jawab atas gen pengkode resistansi untuk golongan obat yang lain misalnya aminoglikosida. Keadaan ini membuat pilihan antibiotika untuk

melawan organisme yang memproduksi ESBLs sangat terbatas (Kaur et al., 2013). Gen blaTEM merupakan gen utama yang menyebabkan ESBLs dan memiliki kemampuan menghidrolisis spektrum luas dari golongan sefalosporin dan dapat meningkat resistansi terhadap aztreonam (Hayyun dkk, 2023). Gen ESBL memiliki beberapa variasi genotif, seperti tipe TEM, CTX-M dan SHV (Rahman dkk, 2018).

Menurut Etebu et al. (2016) gen penyandi enzim β-laktamase ini mampu menyandi penghidrolisis antibiotik. Ampisilin memiliki ikatan kimia yang dihidrolisis. *Extended-spectrum β-lactamase* yang disandi oleh gen blaTEM akan menghidrolisis cincin β-laktam di ampicilin pada ruang periplasma. Ikatan yang putus menyebabkan antibiotik tidak berfungsi. Hal ini terjadi karena reaksi antibiotik dengan *penicillin binding proteins* (PBP) di bakteri terganggu, maka tidak terjadi interaksi β-laktam dengan PBP serta kompleks enzim-asil dan ikatan C-N pada keempat cincin β-laktam menjadi rusak. Titik mutasi muncul selama proses evolusi PBP, sehingga menghasilkan β-laktamase yang dapat menghidrolisis cincin laktam dari antibiotik. Mutasi tersebut umumnya terjadi di daerah *active site* dari enzim sehingga aktivitas enzim tersebut meningkat (Rahman dkk, 2023).

Hasil deteksi gen CTX-M dan SHV tidak ditemukan di ke 6 isolat bakteri. Gen yang tidak terdeteksi dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti rendahnya keberadaan gen CTX-M dan SHV jika dibandingkan dengan gen blaTEM. Kemudian terdapat variasi genotip lainnya seperti OXA, GES, VEB dan PER (Kaur et al., 2013).

Gen Tipe CTX-M (*Cefotaxime Munich*) dalam *plasmid mediated* ESBLs memiliki tingkat hidrolisis yang tinggi terhadap sefotaksim sefalosporin lainnya (Wibisono dkk, 2020). Tipe ini banyak ditemukan pada *Salmonella enterica* dan *Escherichia coli*, tetapi juga ditemukan pada beberapa spesies *Enterobacteriaceae* lain seperti *Klebsiella pneumoniae*. Enzim terdiri atas CTX-M-1, CTX-M-2 hingga CTX-M-10 (Hayyun dkk, 2023).

Analisis gen SHV tidak terlihat pada amplikon 141 bp pada seluruh isolat bakteri *V. parahaemolyticus*. Sulfidril (SHV) tipe-1 beta-laktamase merupakan enzim yang dikode pada plasmid. Gen SHV adalah gen mutasi dari TEM yang menyebabkan kemampuan untuk menghidrolisis cincin beta laktam meningkat hingga pada generasi III sefalosporin dan monobactam. Gen penyandi SHV umumnya ditemukan di *Escherichia coli* (Rupp et al., 2013). Gen SHV merupakan gen mutasi dari TEM yang memiliki fenotif ESBLs. Gen ini ditandai dengan substitusi glisin menjadi serin pada posisi asam amino ke 238. Residu serin pada posisi 238 merupakan penentu efisiensi kemampuan menghidrolisis ceftazidime, sedangkan residu lisin 240 merupakan

penentu efisiensi kemampuan menghidrolisis cefotaxime. Pada beberapa bakteri *Klebsiella* gen SHV dapat terintegrasi dalam kromosom sehingga dapat menghasilkan varian SHV (Sivaraman *et al.*, 2021).

Keberadaan penyandi gen ESBL pada bakteri memicu adanya mutasi gensehingga muncul berbagai variasi gen baru. Mutasi gen pada bakteri akan mempersulit terapi penyebab infeksi sehingga terjadi penurunan kerja antibiotik dan pilihan antibiotik menjadi sangat terbatas (Miranda *et al.*, 2013; Prestinaci *et al.*, 2015). Adanya multi antibiotik resistan di udang putih harus dicegah. Beberapa upaya perlu dilakukan untuk mengurangi penggunaan antibiotik seperti melaksanakan kampanye kesadaran masyarakat dalam penggunaan antibiotik yang tepat dan benar. Upaya lainnya dengan mengurangi penggunaan antibiotik yang tidak perlu di bidang pertanian, pengawasan global terhadap resistansi obat, serta pengembangan tanaman obat dan vaksinasi. Kami merekomendasikan bahwa pemerintah harus meningkatkan pengawasan terhadap penerapan antibiotik untuk mencegah penyalahgunaan penggunaan yang kurang, atau penggunaan yang berlebihan dalam populasi manusia dan di peternakan hewan akuatik.

Maka hasil dari isolat *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari udang putih menunjukkan sensitivitas terhadap enrofloksasin, dan kloramfenikol. Serta resistan terhadap ampisilin. Isolat *Vibrio parahaemolyticus* yang resistan terhadap ampisilin didapatkan adanya gen penyandi resistan blaTEM.

SARAN

Perlu adanya pengawasan pada lingkungan perairan budidaya terhadap keberadaan gen penyandi resistansi antibiotik terutama pada gen beta laktamase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada laboratorium Mikrobiologi Medik dan Farmasi Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB

"Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak terkait dalam penelitian ini".

DAFTAR PUSTAKA

Arber, W. 2014. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *MDPI* 4, 217–224. <https://doi.org/10.3390/life4020217>
Ashofa EA, Sarjito, Prayitno SB. 2014. Identifikasi bakteri *Vibrio* yang berasosiasi dengan penyakit <http://www.journal.ipb.ac.id/index.php/actavetindones>

bakterial pada kepiting bakau (*Scylla serrata*) yang berasal dari Rembang. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 3(2): 118- 125.
[BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2006. SNI 01-2332.5 -2006. *Cara uji mikrobiologi Bagian 5. Penentuan V. parahaemolyticus pada produk perikanan*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *M100*, 28th ed. *The Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne 354.
European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). 2009. Joint Opinion on Antimicrobial Resistance focused on zoonotic infections. *EFSA Journal* 7(11):1372. doi:10.2903/j.efsa.2009.1372. <http://bit.ly/1LZOJJ>.
Etebu E, Ariekpar I. 2016. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* 4: 90–101
Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. 2016. *Vibrio pyogenes*; Basic Biology to Clinical Manifestations. Oklahoma City (US): University of Oklahoma Health Sciences Center. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. 2016. *The negative impact of antibiotic resistance*. *Clinical and Microbiology Infection*. 22: 416–422.
Jeamsripong S, Khant W, Chuanchuen R. 2020. phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultivated oysters and estuarine water. <https://academic.oup.com/femsec/advance-article-abstract/doi/10.1093/femsec/fiaa081/5828078>.
Kaur M, Aggarwal A. 2013. Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM Genes Among the Extended Spectrum β -Lactamase Producing Isolates of Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital of North India. *J Clin Diagn Res.* 7(4):642–5. doi: 10.7860/JCDR/2013/5081.2872. Epub 2013 Apr 1. PMID: 23730637; PMCID: PMC3644435
Khoirani K, Indrawati A, Setiyaningsih S. 2019. *Kajian Resistansi Antibiotik dan Gen Penyandinya pada Escherichia coli Asal Peternakan di Bandung dan Purwakarta*. [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/100755>
Kumar R, Hann Ng T, Wang Han C. 2020. Acute hepatopancreatic necrosis disease in Penaeid Shrimp. *Wiley Online Library. Reviews in Aquaculture* 12(3):1867–1880.
Kusmarwati A, Yennie Y, Indriati N. 2017. Resistansi Antibiotik pada *Vibrioparahaemolyticus* dari Udang *Vannamei* Asal Pantau Utara Jawa untuk Pasar

- Ekspor. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 12(2). doi:10.15578/jpbkp.v12i2.352.
- Miranda CD, Tello A, Keen PL. 2013. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. *Front. Microbiol.* 4:233. 10.3389/fmicb.2013.00233
- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. 2015 Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*. 109(7):309-318.
- Rahman S, Tariq A, Nazir, Ahmad K, Bo H, Jian G, et al. 2018. ID Artikel 9519718. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>.
- Rocha Rdos S, Sousa O. V, Vieira R. H. 2016. Multidrug-Resistant *Vibrio* Associated With an Estuary Affected By Shrimp Farming in Northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 105 (1): 337-340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.001>.
- Rupp ME, and Paul DF. 2013. Extended Spectrume B-Lactamase (ESBL) Producing Enterobac-teriaceae Considerations for Diagnosis. Preventional and Drug Treatmen. *Departemen of Internal Medicine, Universitas of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA*. : 354 – 362.
- Sarjito MA. Haditomo AHC. 2016. Keanekaragaman Agensia Penyebab Vibriosis pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dan Sensitivitasnya Terhadap Antibiotik. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 5(1): 98-107
- Sivaraman GK, Rajan V, Vijayan A, Elangovan R, Prendiville A, Bachmann TT. 2021. Antibiotic Resistance Profiles and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Shrimp Aquaculture Farms in Kerala, India. *Front Microbiol.* 19;12:622891. doi: 10.3389/fmicb.2021.622891. PMID: 34489875; PMCID: PMC8417373.
- [WHO] World Health Organization. 2014. Global Strategy for containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/DRS/2001.2. <http://bit.ly/1CwedEh>.
- Wibisono FJ, Sumiarto B, Untari T, Effendi MH, Permatasari DA, Witaningrum AM. 2020. Short Communication: Pattern of antibiotic resistance on extended-spectrum beta-lactamases genes producing *Escherichia coli* on laying hens in Blitar, Indonesia. *Biodiversitas*. 21 (10): 4631–4635.
- Zorriehzahra J, Banaederakhshan R. 2015. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 3(25):64-72. DOI:10.14737/journal. A avs/ 2015/3.25.64.72 .