

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi sistemik yang disebabkan terjadinya infeksi pada usus halus dan diakibatkan oleh bakteri *Salmonella thyposa* ialah demam tifoid. Kasus demam tifoid di Indonesia berkisar 350-810 per 100.000 penduduk (Sofia et al., 2023). Terdapat sekitar 81,7% per 100.000 kasus demam tifoid di Indonesia yang memerlukan perawatan di rumah sakit (Bellji dan Wulandari, 2023). Dalam penanganan penyakit ini terdapat beberapa obat yang dapat digunakan, antara lain kloramfenikol sebagai terapi lini pertama (Ananta et al., 2023).

Kloramfenikol merupakan terapi lini pertama untuk penyakit demam tifoid sejak tahun 1948. Namun, beberapa tahun kemudian obat ini mulai mengalami resisten terhadap *Salmonella thyposa* diakibatkan penggunaan yang tidak sesuai dan diikuti kasus *multidrug resistant Salmonella thyposa* meningkat di berbagai negara, sehingga diperlukan adanya terapi alternatif untuk penyakit demam tifoid (Rahmawati et al., 2019). Kloramfenikol masih banyak digunakan untuk pengobatan demam tifoid di Indonesia. Penggunaan antibiotik lainnya seperti kotrimoksazol, siprofloksasin, ofloksasin, amoksisilin, sefalosporin generasi ketiga juga digunakan dalam penatalaksanaan demam tifoid namun sebagai alternatif ketika antibiotik kloramfenikol tidak lagi efektif pada pasien (Sukma et al., 2023).

Beberapa terapi alternatif yang dapat digunakan selain kloramfenikol, seperti penggunaan amoksisilin, ampisilin, ciprofloxacilin, kotrimoksazol, dan trimetoprim-sulfametoksazol. Namun, beberapa obat tersebut juga telah mengalami peningkatan resistensi terhadap *Salmonella thyposa*. Penggunaan obat golongan sefalosporin generasi ketiga banyak digunakan pada pengobatan demam tifoid ini, contohnya adalah ceftriaxone. Tetapi kekurangan dari obat ini ialah harganya cukup mahal yang dapat menyebabkan peningkatan biaya pengobatan pasien (Rahmawati et al., 2019; Ananta et al., 2023; Restyana et al., 2022). Selain itu pada penelitian yang dilakukan pada tahun 2022, diketahui bahwa antibiotik ceftriaxone pada bakteri *Salmonella thyposa* menunjukkan kategori intermediet, yaitu kondisi transisi dari keadaan resisten obat namun belum sepenuhnya resisten (Budi dan Sembiring, 2022). Oleh karena itu, penggunaan kloramfenikol dalam penatalaksanaan demam tifoid sampai saat ini tetap digunakan karena masih memiliki efektivitas yang baik, ketersediaan, dan harga kloramfenikol yang relatif lebih murah (Sarmadi et al., 2021). Namun, tak jarang dalam penatalaksanaan demam tifoid diberikan pula suplemen yang



beta karoten, vitamin C, vitamin E, dan *trace element* seperti Zn (11).

Vitamin yang dapat digunakan adalah vitamin E. Vitamin E merupakan molekul lipofilik dengan bentuk paling aktif secara biologis. Pada penelitian sebelumnya, dilakukan pengujian efek sinergis antara antibiotik aminoglikosida, seperti neomisin dan amikasin

terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kombinasi tersebut menghasilkan efek sinergis yang ditunjukkan dengan penurunan KHM dari antibiotik tersebut (Hartmann et al., 2020). Penambahan zat lipofilik seperti vitamin E memungkinkan adanya gangguan pada bakteri, seperti dapat mengganggu membran bakteri, menyebabkan kerusakan pada elemen penting membran seperti kehilangan ion, protein, dan penurunan energi (ATP) (Andrade et al., 2014). Sehingga, diperlukan pengujian terhadap kombinasi antibiotik kloramfenikol dengan vitamin E untuk meningkatkan aktivitas antibakteri dari antibiotik kloramfenikol dalam menangani penyakit akibat infeksi bakteri *Salmonella thyposa*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh dan efek sinergis pemberian vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) pada antibiotik kloramfenikol terhadap pertumbuhan *Salmonella thyposa*?

## 1.3 Tujuan dan Manfaat

### 1.3.1 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dan efek sinergis pemberian vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) pada antibiotik kloramfenikol terhadap pertumbuhan *Salmonella thyposa*.

### 1.3.2 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi metode alternatif dalam penggunaan antibiotik yang telah banyak resisten pada berbagai macam bakteri pada terapi penyakit demam tifoid.



## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin pada bulan November 2024-Januari 2025.

#### 2.2 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah autoklaf (S/S 24lt W/Timer YX-280 DI<sup>®</sup>), oven (Ecocell<sup>®</sup>), *biological safety cabinet* (Thermo Scientific<sup>TM</sup> 1300 Series A2<sup>®</sup>), inkubator (Memmert<sup>®</sup>), *cell culture 96-well* (Biologix<sup>®</sup>), McFarland densitometer (Biosan<sup>®</sup>), mikropipet (Memmert<sup>®</sup>), timbangan analitik (Sartorius<sup>®</sup>), *waterbath* (Memmert<sup>®</sup>), *vortex mixer* (Gemmy<sup>®</sup> type VM-300), spoit (OneMed<sup>®</sup>), dan alat-alat gelas (Pyrex<sup>®</sup>).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kloramfenikol, vitamin E, isolat bakteri *Salmonella thyposa*, NaCl 0,9%, aseton, medium *Mueller-Hinton Broth* (MHB) (Merck<sup>®</sup>), medium *Nutrient Agar* (NA) (Merck<sup>®</sup>), dan reagen *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride* (TTC) (Himedia<sup>®</sup>).

#### 2.3 Metode Kerja

##### 2.3.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih, selanjutnya dibilas menggunakan air dan dikeringkan lalu alat-alat tersebut disterilkan terlebih dahulu. Untuk alat-alat gelas tidak berskala dan terbuat dari logam, disterilkan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam. Untuk alat-alat gelas berskala dan terbuat dari bahan karet juga plastik, disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

##### 2.3.2 Pembuatan Medium

**Pembuatan Medium *Mueller-Hinton Broth*.** Medium yang digunakan adalah medium *Mueller-Hinton Broth* (MHB). Tahapan pembuatannya ialah menimbang medium MHB sebanyak 1,05 gram lalu dilarutkan sampai homogen menggunakan aquadest sebanyak 50 mL sambil dipanaskan menggunakan *waterbath*. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.



**ium *Nutrient Agar*.** Medium yang digunakan adalah medium tahapan pembuatannya ialah menimbang medium NA sebanyak n sampai homogen menggunakan aquadest sebanyak 50 mL menggunakan *waterbath*. Medium disterilkan menggunakan 21°C selama 15 menit.

### 2.3.3 Penyiapan Bakteri Uji

**Peremajaan Bakteri Uji.** Biakan bakteri yang akan diujikan diambil menggunakan ose steril lalu diinokulasikan ke dalam medium Nutrient Agar (NA) miring untuk diremajakan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

**Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.** Bakteri uji yang telah diremajakan diinokulasikan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril dan disesuaikan kekeruhannya dengan larutan standar McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL). Lalu, suspensi bakteri diencerkan sebanyak 0,1 mL dalam 9,9 mL larutan NaCl 0,9% steril hingga diperoleh populasi  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL.

### 2.3.4 Pembuatan Larutan Uji Kloramfenikol

Larutan stok antibiotik kloramfenikol dibuat dengan menimbang kloramfenikol sebanyak 16 mg lalu dilarutkan dalam aseton dan dicukupkan sampai 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok antibiotik kloramfenikol 1.600 µg/mL. Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat dan diperoleh konsentrasi 1.280 µg/mL, 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, dan 2,5 µg/mL (Rudiansyah et al., 2021).

### 2.3.5 Pembuatan Larutan Stok Vitamin E

Larutan uji vitamin E dibuat dengan variasi konsentrasi dimulai dari 45.000 µg/mL, 22.500 µg/mL, 11.250 µg/mL, 5.625 µg/mL, 2.812,5 µg/mL, dan 1.406,25 µg/mL. Tahapan pembuatannya dimulai dengan menimbang 225 mg, 112,5 mg, dan 56,25 mg vitamin E kemudian dilarutkan menggunakan pelarut aseton untuk memperoleh konsentrasi setara dengan 45.000 µg/mL, 22.500 µg/mL, dan 11.250 µg/mL. Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat dimulai dari konsentrasi 25 IU/mL dicuplik 2,5 mL dan dicukupkan dengan 2,5 mL pelarut aseton untuk memperoleh konsentrasi 5.625 µg/mL, 2.812,5 µg/mL, dan 1.406,25 µg/mL (Shahzad et al., 2018).

### 2.3.6 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kloramfenikol

Penentuan KHM dari kloramfenikol dilakukan dengan metode *microdilution checkerboard assay* menggunakan *microplate 96-well*. Dari setiap konsentrasi kloramfenikol, yaitu 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, dan 2,5 µg/mL, masing-masing diambil sebanyak 20 µL lalu dimasukkan ke dalam sumuran *microplate* dan ditambahkan medium MHB dan bakteri *Salmonella thyposa* 20 µL di setiap sumurannya. Setiap sumuran sebesar 200 µL. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator. Setiap sumuran ditetesi reagen TTC 1% dan dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya, cara visual melalui ada tidaknya perubahan warna menjadi



warna merah. Konsentrasi terendah yang tidak terjadi perubahan warna menunjukkan nilai KHM dari kloramfenikol (Celebi et al., 2024).

### 2.3.7 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Vitamin E

Penentuan KHM dari vitamin E dilakukan dengan metode *microdilution checkerboard assay* menggunakan *microplate 96-well*. Dari setiap konsentrasi vitamin E, yaitu 22.500 µg/mL, 11.250 µg/mL, 5.625 µg/mL, 2.812,5 µg/mL, dan 1.406,25 µg/mL, masing-masing diambil sebanyak 20 µL kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *microplate* dan ditambahkan medium MHB sebanyak 160 µL dan bakteri *Salmonella thyposa* 20 µL di setiap sumurannya sehingga total isi setiap sumuran sebesar 200 µL. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam di dalam inkubator. Setelah itu, setiap sumuran ditetesi reagen TTC 1% sebanyak 5 µL lalu dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian, *microplate* diamati ada tidaknya perubahan warna menjadi warna merah. Konsentrasi terendah yang tidak terjadi perubahan warna menunjukkan nilai KHM dari vitamin E (Celebi et al., 2024).

### 2.3.8 Penentuan Nilai Faktor Modulasi (FM)

Faktor modulasi (FM) merupakan rasio nilai KHM antibiotik dengan KHM antibiotik yang ditambahkan dengan senyawa yang bertugas sebagai modulator. Faktor modulasi digunakan untuk mengevaluasi efek modulasi senyawa pada KHM antibiotik. Nilai FM dihitung dengan cara menentukan nilai KHM antibiotik kloramfenikol dengan nilai KHM antibiotik kloramfenikol yang ditambahkan dengan senyawa yang bertugas untuk memberikan efek modulasi, yaitu vitamin E (Muozong et al., 2024; Cabral et al., 2015). Jika nilai  $FM \geq 2$ , menandakan bahwa terjadi peningkatan kerja dari antibiotik yang dikombinasikan dengan vitamin E. Adapun rumus dari penentuan FM, yaitu (Muozong et al., 2024):

$$FM = \frac{\text{KHM Antibiotik}}{\text{KHM Antibiotik + Modulator}}$$

### 2.3.9 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kombinasi

Penentuan KHM dari kombinasi kloramfenikol dengan vitamin E dilakukan dengan metode *microdilution checkerboard assay* menggunakan *microplate 96-well*. Variasi konsentrasi kloramfenikol sebesar 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, dan 2,5 µg/mL, dan variasi konsentrasi vitamin E sebesar 22.500 µg/mL, 11.250 µg/mL, 5.625 µg/mL, 2.812,5 µg/mL, dan 1.406,25



µg/mL dan variasi konsentrasi dari kloramfenikol dan vitamin E diambil kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *microplate* dan ditambahkan medium MHB sebanyak 160 µL dan bakteri *Salmonella thyposa* 20 µL sehingga total isi setiap sumuran sebesar 200 µL. Populasi bakteri yang digunakan pada pengujian ini adalah  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL. Selanjutnya, pengujian dilakukan yang digunakan meliputi kontrol kloramfenikol (20 µL

kloramfenikol + 180  $\mu$ L medium MHB), kontrol vitamin E (20  $\mu$ L vitamin E + 180  $\mu$ L medium MHB) kontrol bakteri uji (20  $\mu$ L bakteri *Salmonella thyposa* + 180  $\mu$ L medium MHB), kontrol pelarut (20  $\mu$ L aseton + 180  $\mu$ L medium MHB), serta kontrol medium (200  $\mu$ L medium MHB). Hal ini dilakukan hingga tiga replikasi. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam di dalam inkubator. Setelah itu, setiap sumuran ditetesi reagen TTC 1% sebanyak 5  $\mu$ L lalu didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit dan diamati secara visual melalui ada tidaknya perubahan warna menjadi warna merah. Konsentrasi terendah yang tidak terjadinya perubahan warna menunjukkan nilai KHM dari kombinasi kloramfenikol dengan vitamin E.

### 2.3.10 Penentuan Nilai Indeks Konsentrasi Hambat Fraksional (*Fractional Inhibitory Concentration Index/FICI*)

Hasil dari pengujian efek sinergitas menggunakan metode *microdilution checkerboard assay* berupa nilai Indeks Konsentrasi Hambat Fraksional atau *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI). Adapun cara penentuan dari nilai Indeks FIC ialah sebagai berikut (Prasetyo et al., 2022).

$$FIC_K = \frac{\text{KHM Kloramfenikol kombinasi Vitamin E}}{\text{KHM Kloramfenikol Tunggal}} \quad (1)$$

$$FIC_E = \frac{\text{KHM Vitamin E kombinasi Kloramfenikol}^{1/2}}{\text{KHM Vitamin E Tunggal}} \quad (2)$$

$$\Sigma \text{ FICI} = FIC_K + FIC_E \quad (3)$$

Setelah nilai indeks FIC dihitung, kemudian dilakukan interpretasi dari hasil yang dapat diklasifikasikan sebagai berikut: interaksi dinyatakan sinergis jika nilai  $FICI \leq 0,5$ ; aditif jika nilai  $FICI > 0,5$  atau  $< 1$ ; indiferen jika nilai  $FICI \geq 1$  dan  $\leq 4$ ; dan antagonis jika nilai  $FICI > 4$  (Abdulabbas et al., 2022). Sinergis merupakan kondisi dimana efek yang dihasilkan dari zat yang dikombinasikan lebih besar jika dari dibandingkan dengan efek yang dihasilkan dari zat tunggal tanpa kombinasi. Kemudian, aditif merupakan kondisi ketika efek yang dihasilkan dari zat yang dikombinasikan sama dengan efek yang dihasilkan dari zat tunggal tanpa kombinasi. Indiferen sendiri merupakan kondisi dimana tidak ada efek yang ditimbulkan dari zat kombinasi karena tidak adanya interaksi yang terjadi. Terakhir, antagonis merupakan kondisi saat efek dari salah satu ataupun kedua zat tersebut menjadi kurang saat dikombinasikan, dibandingkan dengan efek yang dihasilkan dari zat tunggal tanpa kombinasi (Yunilawati et al., 2021).



a

merupakan nilai dari hasil perhitungan *Fractional Inhibitory* (FICI) kombinasi kloramfenikol dengan vitamin E. Selanjutnya an lanjutan berdasarkan hasil yang diperoleh dari pengamatan g diperoleh, sehingga dapat ditarik kesimpulan terkait interaksi dan vitamin E.