

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Angka kasus infeksi saluran kemih (ISK) di Indonesia berkisar 90 hingga 100 kasus per 100.000 penduduk tiap tahunnya atau sekitar 180.000 kasus baru per tahun. Wanita memiliki prevalensi yang lebih tinggi terhadap ISK dibandingkan pria karena anatomi uretra yang lebih pendek. Wanita hamil empat kali lebih mudah untuk mengalami ISK dibandingkan wanita yang tidak hamil. Patogen utama yang menyebabkan ISK adalah *Escherichia coli* yang bertanggung jawab atas 75-90% kasus, diikuti oleh beberapa bakteri gram negatif lainnya (Dharmawan et al., 2024).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Mustika et al. (2022) menyebutkan bahwa antibiotik yang paling aman digunakan untuk mengobati ISK pada ibu hamil adalah ampisilin. Namun data menunjukkan peningkatan signifikan dalam resistensi terhadap ampisilin, mencapai 97% dari tahun 2011 hingga 2020 (Nguyen et al., 2022). Penelitian lain juga mengatakan bahwa *E.coli* telah resisten terhadap ampisilin sebanyak 96,2% di salah satu rumah sakit dengan sampel beberapa ibu hamil yang menderita ISK (Yetera et al., 2024). Antibiotik lain yang dapat digunakan untuk mengobati ISK seperti siprofloksasin dan kotrimoksazol termasuk dalam kategori C dan D pada FDA yang artinya beresiko tinggi terhadap ibu dan janin dibandingkan ampisilin dengan kategori B. Kekurangan antibiotik lini pertama lainnya seperti nitrofurantoin yaitu tidak dapat digunakan oleh ibu hamil trimester akhir karena berisiko anemia hemolitik pada bayi yang baru lahir (Lawati et al., 2024).

Terapi kombinasi dianggap sebagai suatu upaya yang menjanjikan untuk mengatasi bakteri yang resisten terhadap antibiotik. Efek sinergis dari kombinasi dapat lebih efektif dibandingkan jika hanya salah satunya saja. Misalnya seperti kombinasi ampisilin-sulbaktam dan trimethoprim-sulfametoksazol. Penelitian yang dilakukan oleh Hassuna et al. (2023) menemukan bahwa *E. coli* telah resisten sebesar 42% terhadap kombinasi ampisilin-sulbaktam. Kombinasi antara antibiotik seperti trimethoprim dan sulfametoksazol telah digunakan secara klinis dan terbukti efektif. Namun, kelemahan dari kombinasi ini terletak pada potensinya untuk meningkatkan paparan antibiotik yang tidak perlu, yang dapat memperkuat resistensi bakteri. Di sisi lain, kombinasi non-antibiotik dan non-antibiotik masih belum diketahui kemanjurannya terutama dengan kompleksitas cairan tubuh. Oleh karena itu, kombinasi antibiotik dan non-antibiotik dianggap sebagai salah satu metode yang paling menjanjikan agar efek toksik yang dihasilkan lebih sedikit (Xiao et al., 2023).



terapi kombinasi antibiotik dan non-antibiotik yang dapat mengombinasikan antibiotik dengan vitamin. Menurut pustaka, vitamin E dapat melawan penyakit menular seperti infeksi saluran kemih, serta infeksi bakteri yang disebabkan oleh *E. coli* (Hartmann et al., 2023). Studi juga mengatakan bahwa α -tokoferol merupakan bentuk vitamin E yang efektif untuk meningkatkan daya tahan tubuh manusia (Celebi et al., 2023). Asidosis laktat yang dimiliki oleh vitamin E dapat mengurangi stres

oksidatif yang dapat berpotensi memperburuk infeksi dan mempengaruhi pertumbuhan bakteri serta mencegah terjadinya infeksi melalui beberapa mekanisme modulasi imun (Khadim & Fartusie, 2021). Belum adanya penelitian mengenai kombinasi spesifik antibiotik ampisilin dan vitamin E menjadi dasar untuk menguji efek sinergis dari kombinasi antibiotik dan non-antibiotik untuk mengatasi infeksi bakteri *E. coli*.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah terdapat efek sinergis dari kombinasi antibiotik ampisilin dan vitamin E terhadap bakteri *Escherichia coli*.

I.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sinergis dari kombinasi antibiotik ampisilin dan vitamin E terhadap bakteri *Escherichia coli*.



BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

II.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah autoklaf (S/S 24lt W/Timer YX-280 DI[®]), *Biosafety Cabinet Class* (Thermo ScientificTM 1300 Series A2[®]), inkubator (Memmert[®]), oven (Memmert UN55[®]), densitometer (Biosan[®]), vortex (Gemmy[®] type VM-300), *Cell Culture 96-well* (Biologix[®]), spoit (OneMed[®]), mikropipet (Memmert[®]), timbangan analitik (Sartorius[®]), dan alat-alat gelas.

II.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vitamin E (α -tokoferol asetat), ampicilin (*pharmaceutical grade*), bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *medium Nutrient Agar/NA* (Merck[®]), *medium Mueller-Hinton Broth/MHB* (Himedia[®]), larutan NaCl 0,9%, aseton, reagen 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida (TTC) (Himedia[®]).

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Pembuatan medium

1. *Medium Mueller-Hinton Broth*

Medium MHB sebanyak 1,05 g dimasukkan dalam 50 mL air steril kemudian campur dan larutkan seluruhnya. Kemudian medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. *Medium Nutrient Agar*

Medium NA sebanyak 1 g dimasukkan dalam 50 mL air steril kemudian campur dan larutkan dengan bantuan pemanasan. Kemudian medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

II.2.2 Sterilisasi alat

Alat-alat gelas yang tidak memiliki skala disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam. Alat-alat kaca yang memiliki skala serta peralatan yang berbahan dasar karet dan plastik disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

II.2.3 Penyiapan bakteri uji

1. Peremajaan bakteri



isolat bakteri *E. coli* dilakukan dengan menggunakan medium ara diambil satu ose biakan kemudian digores pada agar miring. inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

uspensi bakteri

i *E. coli* disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi NaCl uat setara kekeruhannya dengan larutan standar 0,5 McFarland

(populasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Suspensi bakteri kemudian diencerkan sebanyak 0,1 mL dalam 9,9 mL NaCl 0,9% sehingga didapatkan populasi $1,5 \times 10^6$ CFU/mL.

II.2.4 Pembuatan larutan stok vitamin E

Vitamin E sebanyak 45 mg dilarutkan aseton sebanyak 5 ml sehingga diperoleh konsentrasi 45.000 $\mu\text{g/mL}$ sebagai stok. Lalu vitamin E sebanyak 22,5 mg dan 11,25 mg masing-masing dilarutkan dalam aseton untuk memperoleh konsentrasi setara 22.500 $\mu\text{g/mL}$ dan 11.250 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian dari konsentrasi 11250 $\mu\text{g/mL}$ dilakukan pengenceran bertingkat dengan mencuplik sebanyak 2,5 mL dan dicukupkan dengan 2,5 mL aseton sebagai pelarut sehingga diperoleh konsentrasi 5.625 $\mu\text{g/mL}$, 2.812,5 $\mu\text{g/mL}$, dan 1.406,25 $\mu\text{g/mL}$ (Shahzad et al., 2018).

II.2.5 Pembuatan larutan stok ampisilin

Ampisilin sebanyak 8 mg dilarutkan dalam 10 mL air steril sehingga diperoleh konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$ sebagai stok. Kemudian stok dicuplik sebanyak 2 mL dan dicukupkan hingga 5 mL dengan air steril sebagai pelarut untuk memperoleh konsentrasi 320 $\mu\text{g/mL}$. Setelah itu dilakukan pengenceran bertingkat sehingga diperoleh konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, dan 5 $\mu\text{g/mL}$ (Braggs & Dsouza, 2021).

II.2.6 Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM)

II.2.6.1 Penentuan KHM vitamin E

Konsentrasi hambat minimum vitamin E (α -tokoferol asetat) ditentukan dengan menggunakan metode *microdilution checkerboard assay* pada *microplate* 96 wells. Sebanyak 20 μL tiap konsentrasi vitamin E (22.500 $\mu\text{g/mL}$, 11.250 $\mu\text{g/mL}$, 5.625 $\mu\text{g/mL}$, 2.812,5 $\mu\text{g/mL}$, dan 1.406,25 $\mu\text{g/mL}$) dimasukkan kedalam *microplate* yang berisi 160 μL medium MHB dan bakteri uji *E. coli* sebanyak 20 μL sehingga total tiap sumuran adalah 200 μL . Kemudian *microplate* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, tiap sumuran ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 5 μL lalu dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang. *Microplate* diamati secara visual dengan melihat adanya perubahan warna merah. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak terjadinya perubahan warna merah adalah nilai KHM (Celebi et al., 2024).

II.2.6.2 Penentuan KHM ampisilin



Konsentrasi hambat minimum ampisilin ditentukan dengan menggunakan *checkerboard assay* pada *microplate* 96 wells. Sebanyak 20 μL ampisilin (160 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, dan 5 $\mu\text{g/mL}$) dimasukkan kedalam *microplate* yang berisi 160 μL medium MHB dan bakteri uji *E. coli* sebanyak 20 μL sehingga total tiap sumuran adalah 200 μL . Kemudian *microplate* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, tiap sumuran ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 5 μL lalu dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang. *Microplate* diamati secara visual

dengan melihat adanya perubahan warna merah. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak terjadinya perubahan warna merah adalah nilai KHM (Celebi et al., 2024).

II.2.6.3 Penentuan KHM kombinasi ampisilin dan vitamin E

Konsentrasi hambat minimum kombinasi ampisilin dan vitamin E (α -tokoferol) ditentukan dengan menggunakan metode *microdilution checkerboard assay* pada *microplate* 96 wells. Sebanyak 10 μ L tiap konsentrasi vitamin E (45.000 μ g/mL, 22.500 μ g/mL, 11.250 μ g/mL, 5.625 μ g/mL, dan 2.812,5 μ g/mL) dan 10 μ L tiap konsentrasi ampisilin (320 μ g/mL, 160 μ g/mL, 80 μ g/mL, 40 μ g/mL, 20 μ g/mL, 10 μ g/mL) dimasukkan kedalam *microplate* yang berisi 160 μ L medium MHB dan bakteri uji *E. coli* sebanyak 20 μ L sehingga total tiap sumuran adalah 200 μ L. Populasi bakteri yang digunakan yaitu $1,5 \times 10^6$ CFU/mL. Kontrol pada pengujian meliputi kontrol ampisilin (20 μ L ampisilin + 180 μ L MHB), kontrol vitamin E (20 μ L vitamin E + 180 μ L MHB), kontrol bakteri (20 μ L bakteri + 180 μ L MHB), kontrol pelarut ampisilin (20 μ L ampisilin + 160 μ L air steril), kontrol pelarut vitamin E (20 μ L vitamin E + 160 μ L aseton), kontrol bakteri uji (20 μ L bakteri *E. coli* + 180 μ L medium MHB), dan kontrol medium (200 μ L medium MHB). Hal ini dilakukan sebanyak tiga replikasi. Kemudian *microplate* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, tiap sumuran ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 5 μ L lalu dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang. *Microplate* diamati secara visual dengan melihat adanya perubahan warna merah. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak terjadinya perubahan warna merah adalah nilai KHM (Celebi et al., 2024).

II.2.7 Penentuan nilai konsentrasi fraksional (Fractional Inhibitory Concentration/FICI) kombinasi ampisilin dan vitamin E

Penentuan nilai konsentrasi hambat fraksional (*Fractional Inhibitory Concentration Index/FICI*) kombinasi antara ampisilin dan vitamin E secara matematis adalah sebagai berikut (Noel et al., 2021):

$$FIC_1 = \frac{\text{KHM ampisilin dengan penambahan vitamin E}}{\text{KHM ampisilin}} \quad (1)$$

$$FIC_2 = \frac{\text{KHM vitamin E dengan penambahan ampisilin}}{\text{KHM vitamin E}} \quad (2)$$

$$FICI = FIC_1 + FIC_2 \quad (3)$$

Interaksi secara *in vitro* antara agen antibakteri dapat ditentukan dengan rumus tersebut, efeknya dapat dituliskan sebagai berikut:

Sinerjis : nilai FICI ≤ 0.5



: FICI > 0.5 atau ≤ 1

: FICI > 1 atau ≤ 4

: FICI > 4

II.2.8 Perhitungan nilai faktor modulasi (FM)

Faktor modulasi adalah rasio dari KHM antibiotik tunggal dan kombinasi antibiotik dengan modulatornya, di mana pada penelitian ini faktor modulasi ditentukan dengan cara membandingkan KHM ampisilin tunggal dan KHM kombinasi ampisilin dengan vitamin E pada konsentrasi subinhibitor sebagai modulator. Nilai faktor modulasi dapat dikatakan signifikan apabila nilai $FM \geq 4$ (Coelho et al., 2015). Rumus untuk menentukan nilai faktor modulasi adalah sebagai berikut (Lechner et al., 2008):

$$FM = \frac{\text{KHM antibiotik}}{\text{KHM antibiotik+modulator}}$$

II.2.9 Analisis data

Analisis data dilakukan berdasarkan hasil dari perhitungan penentuan *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) kemudian dilakukan pembahasan dari data dan hasil pengamatan yang diperoleh lalu ditarik kesimpulan.

