



**EFEK PENAMBAHAN VITAMIN C TERHADAP AKTIVITAS
CIPROFLOXACIN DALAM PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Kardiana Izza Ell Milla
NIM 122010101031**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**EFEK PENAMBAHAN VITAMIN C TERHADAP AKTIVITAS
CIPROFLOXACIN DALAM PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran (S1) dan mencapai gelar sarjana

Oleh

**Kardiana Izza Eli Milla
NIM 122010101031**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

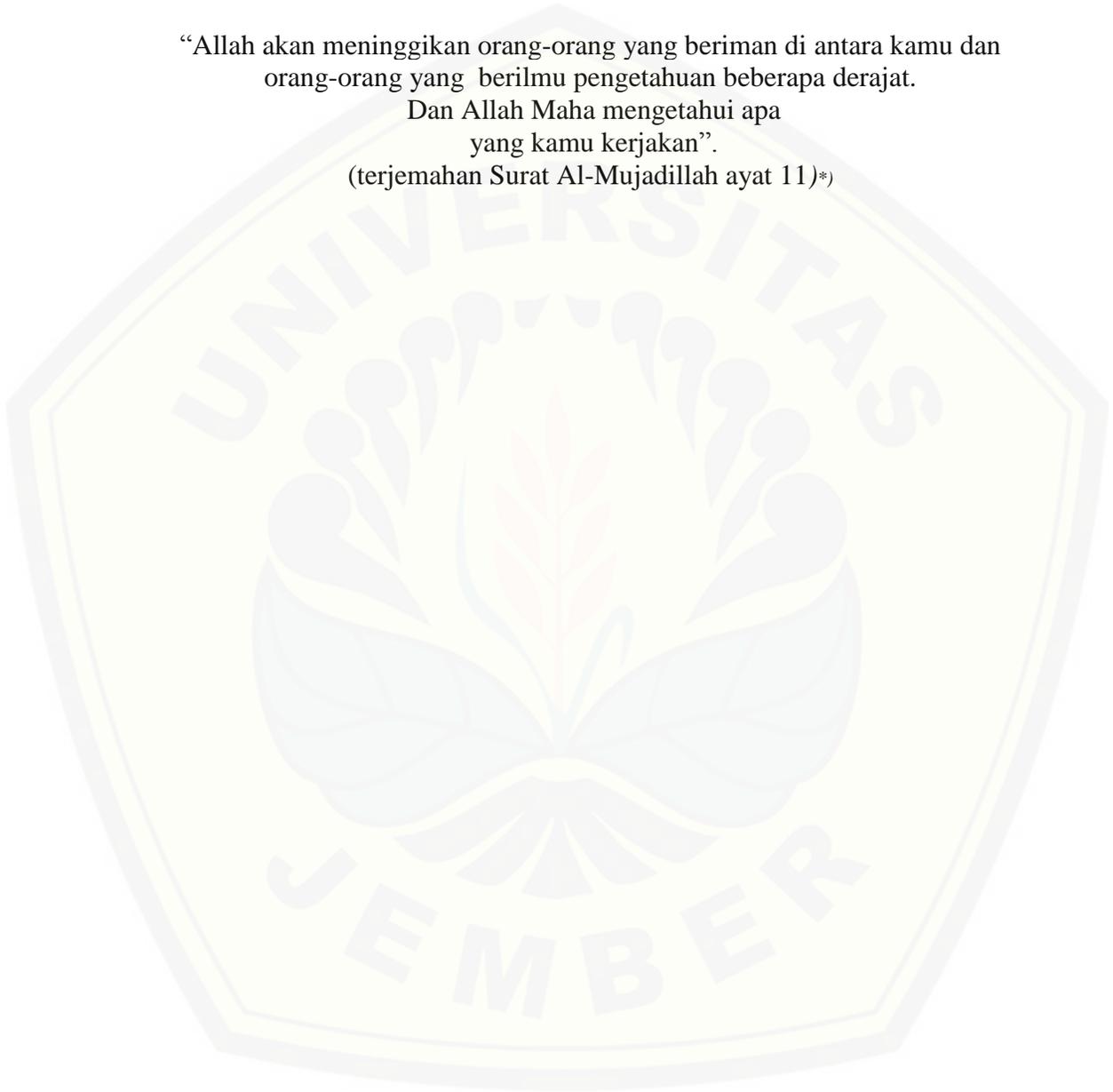
1. Allah SWT, yang telah memberi limpahan rahmat, hidayah dan keberkahan-Nya sehingga saya mendapat kesempatan dalam menuntut ilmu, beserta Nabi Muhammad SAW yang menjadi tauladan dan membawa ke zaman yang penuh dengan ilmu seperti saat ini;
2. Kedua orang tua, bapak Drs. Didik Siswanto, M.Pd dan ibu Dra. Karsih Ratnawati serta kakak dan adikku yang telah memberikan doa, cinta, nasihat, kasih sayang, dan pengorbanan dalam mendidik dan membesarkan saya;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, yang telah memberikan ilmu dan mencurahkan segala kemampuannya untuk membimbing saya;
4. Guru-guru formal dan informal saya yang terhormat, yang selalu mendidik saya dengan penuh ketulusan dan kesabaran;
5. Organisasi mahasiswa, Badan Pers Nasional Ikatan Senat Mahasiswa Kedokteran Indonesia (BPN ISMKI), Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Tim Bantuan Medis Vertex (TBM Vertex), yang telah memberikan saya kesempatan untuk belajar dan mengembangkan kemampuan dalam bidang komunikasi dan koordinasi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang berilmu pengetahuan beberapa derajat.

Dan Allah Maha mengetahui apa yang kamu kerjakan”.

(terjemahan Surat Al-Mujadillah ayat 11)*



* Departemen Agama Republik Indonesia. 2002. Mushaf Al-Qur'an Terjemah. Depok: Gema Insani.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Kardina Izza Ell Milla

NIM : 122010101031

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Penambahan Vitamin C terhadap Aktivitas Ciprofloxacin pada Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Desember 2015
Yang menyatakan,

Kardiana Izza Ell Milla
NIM 122010101031

SKRIPSI

**EFEK PENAMBAHAN VITAMIN C TERHADAP AKTIVITAS
CIPROFLOXACIN DALAM PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA *IN VITRO***

Oleh

Kardiana Izza Ell Milla
NIM 122010101031

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. Dini Agustina, M.Biomed

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Jauhar Firdaus

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Penambahan Vitamin C terhadap Aktivitas Ciprofloxacin dalam Penghambatan Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro” telah diuji dan disahkan pada:

hari : Selasa
tanggal : 29 Desember 2015
tempat : Ruang Sidang Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP 19840916 200801 2 003

Penguji II

dr. M. Ali Shodikin, M.Kes., Sp.A
NIP 19770625 200501 1 002

Penguji III

dr. Dini Agustina, M.Biomed
NIP 19830812 200812 2 003

Penguji IV

dr. Jauhar Firdaus
NIP 19830125 200812 1 001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M. Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

“Efek Penambahan Vitamin C terhadap Aktivitas Ciprofloxacin dalam Penghambatan Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro”

Kardiana Izza Ell Milla; 122010101031; 2012; 59 Halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang menyebabkan infeksi nosokomial. Bakteri ini menyebabkan pneumonia yang disebabkan oleh penggunaan ventilator di ruang *Intensive Care Unit* dengan tingkat mortalitas tinggi. Selain itu *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri penyebab otitis, keratitis, dan osteomielitis. Ciprofloxacin merupakan antibiotik pilihan untuk infeksi yang disebabkan *Pseudomonas aeruginosa* namun resistensi ciprofloxacin di Indonesia dilaporkan meningkat. Penyebab meningkatnya resistensi adalah terbentuknya faktor resistensi yaitu biofilm dan *efflux pump* yang berhubungan dengan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS). Vitamin C merupakan suplemen harian masyarakat Indonesia yang memiliki kandungan antioksidan tinggi. Antioksidan dapat menetralkan ROS yang dihasilkan oleh bakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa terdapat efek kombinasi ciprofloxacin dan vitamin C terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro, dan mengetahui konsentrasi minimum vitamin C yang dapat mempengaruhi aktivitas antibiotik ciprofloxacin.

Penelitian dilaksanakan pada bulan November-Desember 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Kombinasi obat yang digunakan pada penelitian ini adalah ciprofloxacin 5µg/µl yang dikombinasikan dengan vitamin C dengan 5 konsentrasi yaitu 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; 40 mg/ml. Pada kelompok kontrol positif (K+) diberikan ciprofloxacin 5µg/5µl, kelompok kontrol negatif (K-) diberikan *aquabidest* 5 µl.

Penelitian ini menggunakan metode *disc diffusion* yaitu dengan cara meneteskan larutan pada cakram kosong yang selanjutnya diletakkan pada cawan berisi *Mueller Hinton Agar* yang telah diinokulasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Diameter zona hambat tiap konsentrasi berturut-turut 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; 40 mg/ml adalah 23,06; 23,98; 25,72; 26,43; 27,75 mm sedangkan kontrol positif menghasilkan diameter zona hambat 22,56 mm yang menunjukkan terapi yang digunakan masih sensitif (≥ 21 mm) terhadap *P.aeruginosa* namun bakteri tersebut mudah menjadi resisten pada terapi inisial atau terapi jangka panjang sehingga dibutuhkan diameter zona hambat yang tidak mendekati ambang batas sensitif.

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan uji korelasi *pearson* dan uji regresi logaritmik. Hasil uji korelasi *pearson* menunjukkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara variabel bebas dan variabel terikat dengan arah korelasi bersifat positif dan keeratan yang sangat kuat. Dengan kata lain semakin besar konsentrasi vitamin C yang diberikan maka dapat meningkatkan diameter zona hambat *P.aeruginosa* pada MHA. Pada uji beda *One Way Anova* diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari pengaruh pemberian kombinasi ciprofloxacin dan vitamin C terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Pada *Post Host Test* diketahui bahwa tidak ada perbedaan antara kontrol positif dan kelompok kombinasi ciprofloxacin dan vitamin C 2,5mg/ml. Uji regresi logaritmik didapatkan persamaan regresi $Y=21,458+1,707\ln(X)$. Dari persamaan tersebut diketahui bahwa konsentrasi vitamin C 1,9 mg/ml yang ditambahkan pada ciprofloxacin mulai mampu menambah penghambatan pertumbuhan *P.aeruginosa* pada media MHA. Kesimpulan dalam penelitian ini adalah penambahan vitamin C memiliki efek meningkatkan aktivitas ciprofloxacin dalam penghambatan pertumbuhan *P.aeruginosa* secara *in vitro* dan konsentrasi minimum vitamin C yang mempengaruhi aktivitas ciprofloxacin terhadap penghambatan pertumbuhan *P.aeruginosa* adalah sebesar 1,9 mg/ml.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi Ciprofloxacin dan Vitamin C dalam Penghambatan Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Dini Agustina, M.Biomed., selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) dan dr. Jauhar Firdaus, selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
3. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si, selaku Dosen Penguji I dan dr. Ali Shodikin, M.Kes,Sp.A selaku Dosen Penguji II yang telah menyempatkan waktu untuk menguji skripsi ini.
4. dr. Rini Riyanti, Sp.PK selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama studi;
5. dr. Ancah Chaesarina Novi, Ph.D., selaku koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
6. Ayahanda Drs. Didik Siswanto,M.Pd. dan Ibunda Dra. Karsih Ratnawati tercinta yang telah menjadi orangtua terbaik, yang selalu memberikan banyak motivasi dan nasehat, yang tiada lelah memberikan kasih sayang dan doa.
7. Kakakku tercinta, Irdiena Izza Ell Milla, S.ST., juga saudara kembarku tersayang Kardiani Izza Ell Milla;

8. Sahabat-sahabat saya Intan Palupi, Chandra Puspita K.S.P., dan Anggita yang telah memberikan semangat dan motivasi;
9. Rekan satu tim penelitian saya, Bagus Dwi Kurniawan, Intan Palupi dan Farmitalia Nisa T. terimakasih atas dukungan, kerjasama dan tenaga usahanya hingga akhir;
10. Tenaga Analis Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Mbak Lilis Lestari, A.Md. yang telah meluangkan waktu, membantu, dan membimbing selama penelitian;
11. Teman-teman angkatan 2012 yang selalu saling mendukung dan menjadi teman seperjuangan demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran;
12. Teman-teman kosan tercinta, Jl. Mastrip 2 No. 23 A yang telah banyak memberikan bantuan dan doa selama penulisan ini berlangsung
13. Teman-teman KKN Kelompok 160 atas dukungan dan doa;
14. Saudara-saudara Angkatan X TBM Vertex atas dukungan dan doa
15. Pengurus Harian Nasional BPN ISMKI 2015-2016 yang telah memberikan semangat dan dukungan.
16. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca dan khususnya untuk perkembangan Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Jember, 29 Desember 2015

Penulis

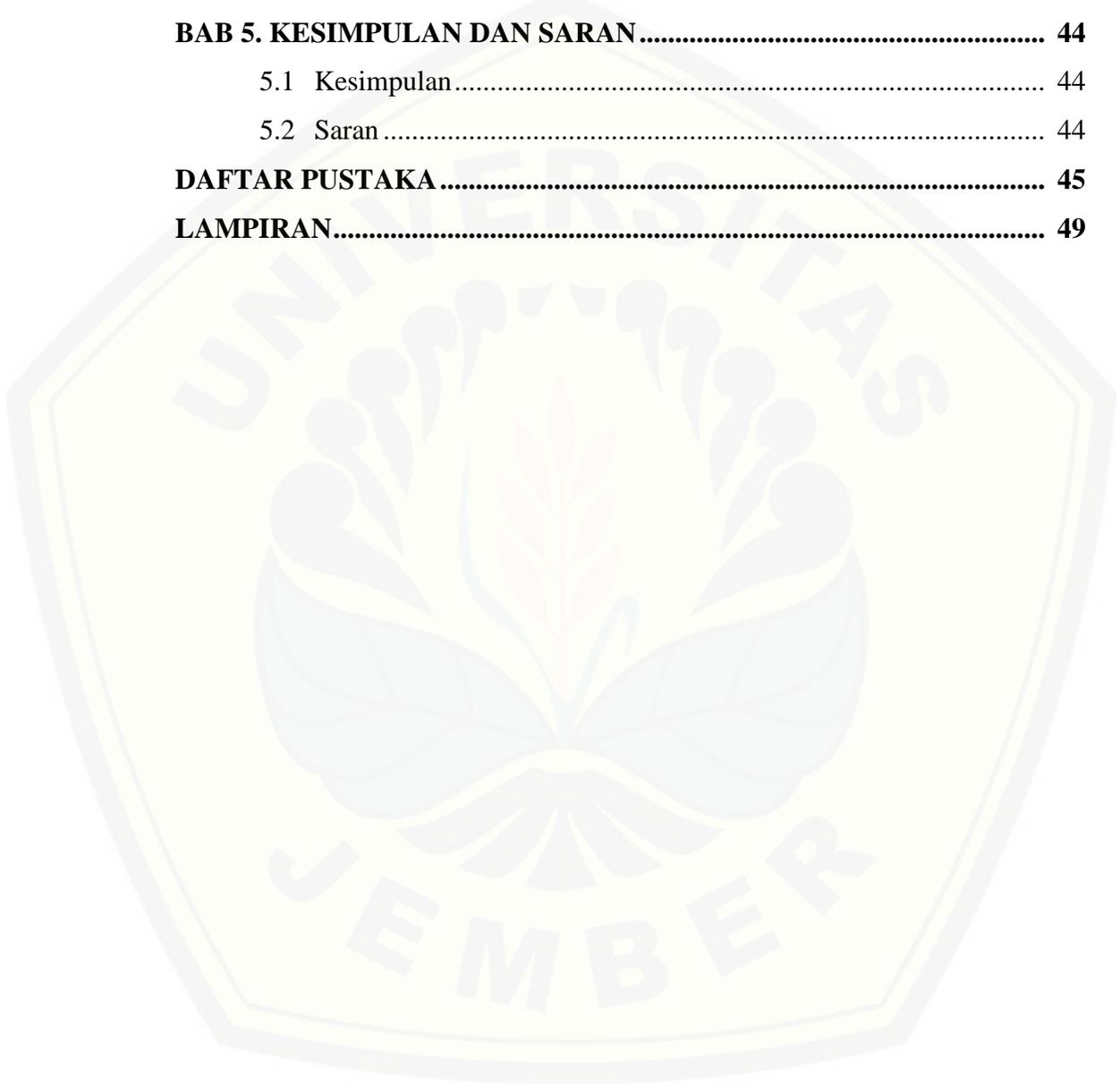
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN BIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat.....	3
1.4.1 Manfaat Teoritis	3
1.4.2 Manfaat Aplikatif	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.1.1 Klasifikasi.....	5
2.1.2 Morfologi.....	5
2.1.3 Faktor Virulensi.....	8

2.1.4	Biofilm.....	8
2.1.5	Obat.....	10
2.2	Ciprofloxacin.....	10
2.2.1	Farmakodinamik.....	11
2.2.2	Farmakokinetik.....	11
2.2.3	Indikasi	12
2.2.4	Efek Samping dan Interaksi Obat.....	12
2.2.5	Sediaan	12
2.3	Vitamin C	12
2.3.1	Farmakodinamik.....	13
2.3.2	Farmakokinetik.....	14
2.3.3	Indikasi	15
2.3.4	Sifat Antioksidan.....	16
2.3.5	Efek Samping	17
2.3.6	Sediaan	17
2.4	Metode Pengujian Antibiotik	18
2.4.1	Dilusi	18
2.4.2	Difusi	19
2.5	Kombinasi Obat.....	19
2.6	Kerangka Konsep	21
2.7	Hipotesis Penelitian	22
BAB 3. METODE PENELITIAN.....		23
3.1	Jenis Penelitian	23
3.2	Rancangan Penelitian	23
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.4	Variabel Penelitian	25
3.4.1	Variabel Bebas.....	25
3.4.2	Variabel Terikat.....	25

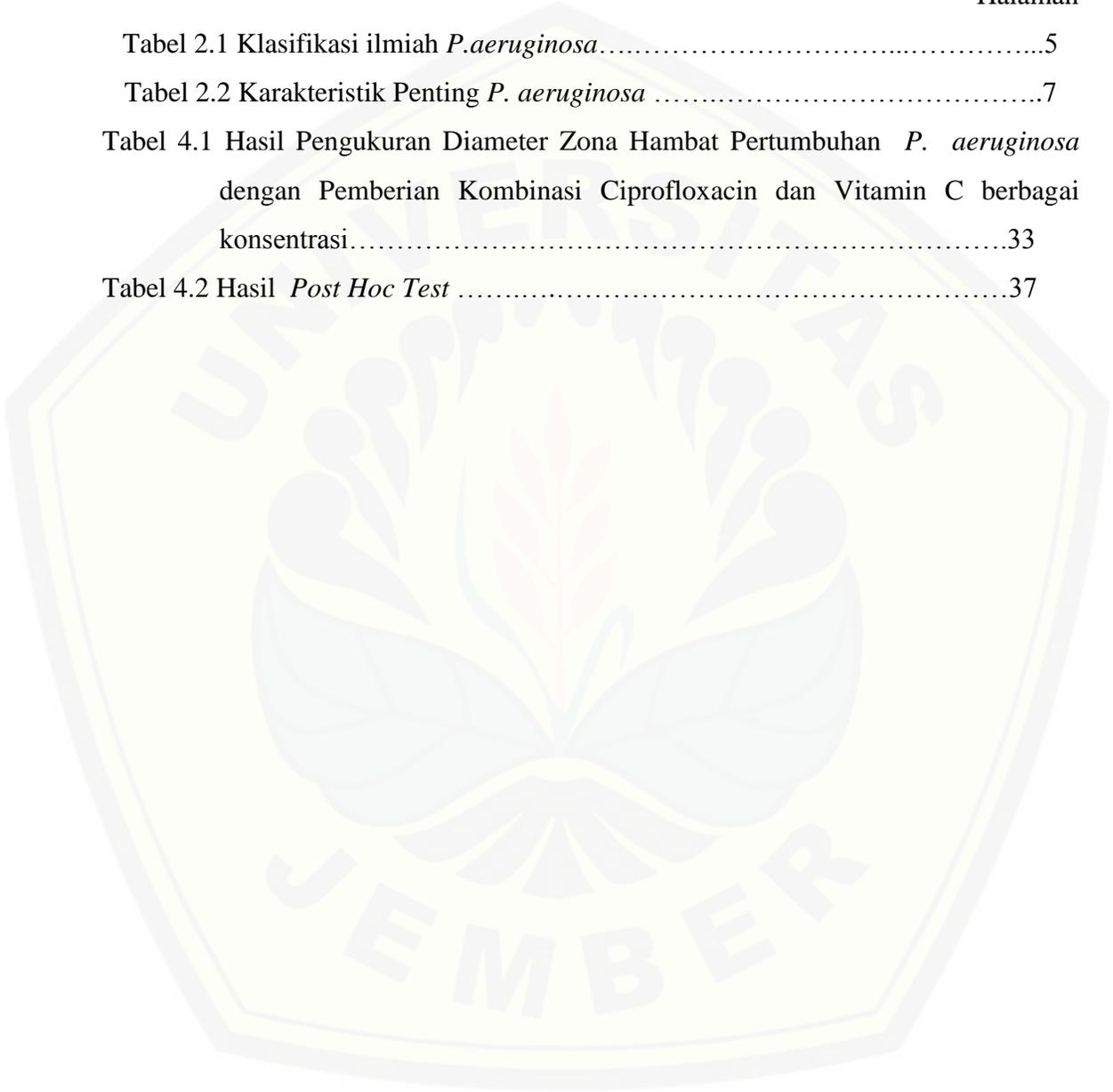
3.4.3	Variabel Kontrol.....	25
3.5	Definisi Operasional.....	25
3.5.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3.5.2	Pertumbuhan Bakteri.....	26
3.5.3	Ciprofloxacin.....	26
3.5.4	Vitamin C.....	26
3.5.5	Kombinasi Vitamin C dan Ciprofloxacin.....	26
3.5.6	Diameter Zona Hambat.....	26
3.5.7	Uji Sensitifitas.....	27
3.6	Alat dan Bahan.....	27
3.6.1	Alat.....	27
3.6.2	Bahan.....	27
3.7	Prosedur Penelitian.....	27
3.7.1	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	27
3.7.2	Pembuatan Media dan Peremajaan Bakteri.....	28
3.7.3	Pembuatan Media <i>Mueller Hinton Agar</i>	28
3.7.4	Pembuatan Larutan.....	29
3.7.5	Pembuatan Cakram Larutan.....	29
3.7.6	Pembuatan Suspensi Bakteri.....	29
3.7.7	Inokulasi Bakteri.....	29
3.7.8	Inkubasi.....	30
3.7.9	Pengamatan.....	30
3.8	Analisis Data.....	30
3.9	Alur Penelitian.....	31
3.10	Uji Kelayakan Etik.....	32
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1	Hasil Penelitian.....	33
4.1.1	Tempat, Waktu dan Sampel Penelitian.....	33

4.1.2 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat	33
4.2 Analisis Data	36
4.3 Pembahasan	39
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN.....	49



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi ilmiah <i>P.aeruginosa</i>	5
Tabel 2.2 Karakteristik Penting <i>P. aeruginosa</i>	7
Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i> dengan Pemberian Kombinasi Ciprofloxacin dan Vitamin C berbagai konsentrasi.....	33
Tabel 4.2 Hasil <i>Post Hoc Test</i>	37



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Bakteri <i>P.aeruginosa</i> Pengecatan Gram Perbesaran 40x.....	6
Gambar 2.2 Koloni <i>P.aeruginosa</i> dari Spesimen Klinik.....	7
Gambar 2.3 Perkembangan Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	9
Gambar 2.4 Skema Konseptual	21
Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian.....	24
Gambar 3.2 Alur Penelitian.....	31
Gambar 4.1 Zona hambat <i>P. aeruginosa</i> yang terjadi pada media <i>Mueller Hinton</i> <i>Agar</i> pada kelompok kontrol dan perlakuan.....	35
Gambar 4.2 Diagram Batang Rata-Rata Diameter Zona Hambat Pertumbuhan <i>P.aeruginosa</i> Setelah Kontak dengan Kombinasi Ciprofloxacin dan Berbagai Tingkat Konsentrasi Vitamin C.....	33
Gambar 4.3 Kurva Regresi logaritmik.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

A. Keterangan Persetujuan Etik	49
B. Uji Normalitas.....	51
C. Uji Homogenitas.....	52
D. Uji Beda	53
E. Uji Korelasi	55
F. Uji Regresi Logaritmik.....	56
G. Dokumentasi Penelitian.....	57

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan insidensi penyakit infeksi akibat bakteri yang masih tinggi. Infeksi tersebut dapat terjadi secara individual, komunitas ataupun nosokomial. Dari ketiga hal tersebut infeksi nosokomial merupakan infeksi yang berpotensi menimbulkan masalah serius karena infeksi tersebut diperkirakan meningkat 40% tiap tahun di negara berkembang di Asia dan Afrika termasuk Indonesia (KemenKes RI, 2011).

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) adalah salah satu bakteri gram negatif penyebab infeksi nosokomial. Bakteri ini merupakan 30,8% bakteri yang ditemukan dari isolasi bakteri dari sputum pasien di ICU RS dr. Soetomo Surabaya (Tyas *et al.*, 2013). *P.aeruginosa* merupakan penyebab pneumonia akibat penggunaan ventilator dengan tingkat mortalitas hingga 57,2% (Saragih *et al.*, 2014).

P.aeruginosa juga ditemukan sebagai flora normal pada tubuh manusia dalam jumlah sedikit pada permukaan kulit. Pada luka bakar bakteri ini sering menjadi penyulit. Kemampuan *P.aeruginosa* hidup pada tanah dan air ledeng menyebabkan bakteri ini seringkali menyebabkan ulkus kornea, otitis, penyulit luka bakar dan penyakit lainnya (Sears *et al.*, 2012). Sifat bakteri *P.aeruginosa* yang mampu mudah berkembang diberbagai kondisi menyebabkan bakteri ini dapat menimbulkan banyak manifestasi klinis.

Terapi *P.aeruginosa* dilaporkan 33-76% resisten terhadap berbagai macam antibiotik. Selama ini pilihan antibiotik pada terapi *P.aeruginosa* adalah dengan menggunakan ciprofloxacin yang merupakan salah satu antibiotik golongan

gan flurokuinolon. Sensitifitas ciprofloxacin di Indonesia untuk *P. aeruginosa* sebesar 67%. Angka tersebut jauh di bawah sensitifitas ciprofloxacin untuk *P. aeruginosa* di Amerika yaitu 90,2% (Mardiastuti *et al.*, 2007).

Penurunan sensitivitas *P.aeruginosa* terhadap ciprofloxacin diperantarai oleh pembentukan biofilm dan *efflux pump* yang menyebabkan ciprofloxacin tidak dapat terserap sempurna dalam bakteri (Morita *et al.*, 2014). Pembentukan biofilm dan *efflux pump* tersebut diprakarsai oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Grant *et al.*, 2010). Dengan adanya antioksidan untuk menangkap ROS memungkinkan untuk menekan pertumbuhan faktor resistensi tersebut.

Antioksidan yang paling dikenal oleh masyarakat Indonesia adalah Vitamin C. Vitamin ini biasanya didapat dalam bentuk suplemen tablet maupun dari kandungan makanan yang dikonsumsi sehari-hari. Vitamin C dianggap dapat meningkatkan status imun sehingga tidak jarang dikonsumsi bersama obat lainnya dalam suatu terapi. Pada kombinasi vitamin C dengan levofloxacin menunjukkan peningkatan penghambatan bakteri-bakteri infeksi saluran kemih (Gebaly *et al.*, 2012). Hal yang sama ditunjukkan pada kombinasi vitamin C bersama kloramfenikol menunjukkan peningkatan penghambatan pertumbuhan bakteri secara *in vitro* (Abbas, 2012).

Vitamin C secara *in vitro* telah diteliti memiliki efek sebagai inhibitor *efflux pump* pada bakteri *Escherichia coli* (Serry *et al.*, 2008). Selain itu vitamin C juga terbukti dapat menurunkan pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* secara *in vitro* (Abbas *et al.*, 2012).

Penelitian mengenai kombinasi ciprofloxacin dan vitamin C terhadap bakteri *P.aeruginosa* belum pernah dilakukan. Berdasarkan hal tersebut penulis ingin melakukan penelitian yang bertujuan untuk melihat efek kombinasi antibiotik ciprofloxacin dan vitamin C terhadap pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* secara *in vitro*. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai eradikasi *P. aeruginosa* yang tepat

1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana efek penambahan vitamin C terhadap aktivitas ciprofloxacin dalam penghambatan pertumbuhan *P. aeruginosa* secara *in vitro*?
- b. Berapakah konsentrasi minimum vitamin C yang dapat mempengaruhi aktivitas ciprofloxacin terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek penambahan vitamin C terhadap aktivitas ciprofloxacin dalam penghambatan pertumbuhan *P. aeruginosa* secara *in vitro*

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui konsentrasi minimum vitamin C yang dapat mempengaruhi aktivitas ciprofloxacin terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

- a. Bagi Peneliti yaitu menambah wawasan tentang penambahan vitamin C pada antibiotik ciprofloxacin dan vitamin C terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.
- b. Bagi institusi pendidikan diharapkan dapat digunakan sebagai bahan informasi penelitian lebih lanjut mengenai penambahan vitamin c terhadap aktivitas ciprofloxacin.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Memberi referensi kepada dokter untuk mempertimbangkan pemberian ciprofloxacin dan vitamin C pada infeksi *P. aeruginosa*

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) berasal dari kata *Pseudomonas* (Yunani: *pseudes* berarti palsu dan *monas* berarti unit) dan *aeruginosa* (Latin: *aeruginosus* berarti karat yang berwarna hijau). Bakteri ini merupakan batang gram-negatif dengan flagel pada kedua kutubnya yang bersifat oksida positif dan aerob obligat (Johnson *et al.*, 2011).

P. aeruginosa tersebar luas di alam dapat berada pada tumbuhan, tanah dan air. Bakteri ini mampu tumbuh cepat walaupun pada air suling dan air saluran. Selain itu bakteri ini sering ditemukan sebagai flora normal usus dan kulit manusia dalam jumlah kecil bertindak sebagai saprofit (Brook *et al.*, 2011).

P.aeruginosa juga bersifat oportunistik. Pada pasien dengan tanggapan imun lemah *P. aeruginosa* dapat menyebabkan pneumonia pada fibrosis kistik, gagal nafas, bakterimia, dan selulitis pada luka bakar (Sears *et al.*, 2012). Selain itu *P. aeruginosa* juga menyebabkan infeksi telinga dan mata. Nanah yang timbul akibat infeksi bakteri ini memiliki warna biru-hijau klasik (Johnson *et al.*, 2011). Selain itu *P. aeruginosa* merupakan bakteri penyebab osteomielitis pada anak dan penyebab dari folikulitis, yaitu infeksi bakteri superfisial pada folikel rambut yang ditandai dengan jerawat kecil dengan puncak berwarna putih akibat berendam dalam air yang terkontaminasi bakteri *P. aeruginosa* (Sears *et al.*, 2012).

P. aeruginosa merupakan bakteri nomor satu penyebab pneumonia pada pasien pengguna ventilator (Tyas *et al.*, 2013). Bakteri ini dapat menyebabkan endokarditis pada pasien dengan katub jantung buatan (Hasan&Al-Riyami,2012). Septikemia yang disebabkan *P. aeruginosa* sering dihubungkan

dengan penggunaan kateter intravena yang terkontaminasi bakteri *P.aeruginosa* (Werth *et al.*, 2015).

2.1.1 Klasifikasi *P.aeruginosa*

Pemberian nama bakteri *P.aeruginosa* memakai sistem penamaan binomial. Klasifikasi *P.aeruginosa* dapat dilihat pada tabel 2.1 berikut ini.

Tabel 2.1 Klasifikasi ilmiah *P.aeruginosa*

Tingkatan	Klasifikasi ilmiah <i>P. aeruginosa</i>
Kingdom	Bacteria
Filum	Proteobacteria
Kelas	Gamma Proteobacteria
Ordo	Pseudomodales
Famili	Pseudomonadaceae
Genus	<i>Pseudomonas</i>
Spesies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

(Sumber: Siegrist, 2010)

2.1.2 Morfologi

P. aeruginosa bersifat motil, tidak membentuk spora, dapat ditemukan dalam bentuk tunggal atau rantai pendek, dan berbentuk batang. Organisme tersebut bersifat aerob obligat dan dapat tumbuh pada berbagai media yang umum dipakai untuk mengisolasi bakteri. Pada mikroskop elektron, bakteri ini tampak sebagai sel berbentuk batang, tidak berspora, motil dengan flagel pada salah satu ujungnya . Pada pewarnaan gram terlihat sebagai bakteri berbentuk batang yang bewarna merah (Brooks *et al.*, 2011).



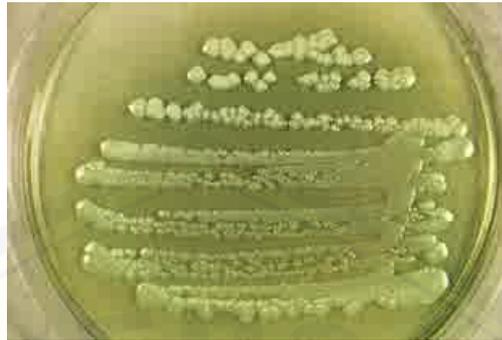
Gambar 2.1 Bakteri *P. aeruginosa* pada pewarnaan gram perbesaran 40x
(Sumber: Todar, 2012)

Bakteri ini memiliki bau spesifik bau seperti anggur (Johnson *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* dapat tumbuh dengan baik pada suhu 35-42°C, pertumbuhannya pada suhu 42°C membantu membedakan spesies ini dari spesies *Pseudomonas* lainnya dalam kelompok fluoresensi. Bakteri ini bersifat oksidase-positif dan tidak memfermentasikan karbohidrat (Brooks *et al.*, 2011).

P. aeruginosa adalah bakteri yang bersifat aerob obligat yaitu membutuhkan oksigen untuk melakukan metabolisme sel dalam memproduksi energi. Bakteri ini dapat mudah tumbuh pada semua media pertumbuhan, karena membutuhkan nutrisi sederhana seperti karbon dan nitrogen. Bakteri ini memproduksi pigmen yang larut air:

- a. Pigmen piosianin, yaitu pigmen biru hijau yang tidak berfluoresensi
- b. Pigmen pioverdin yaitu pigmen kuning kehijauan berfluoresensi
- c. Pigmen piorubin yaitu pigmen yang berwarna merah gelap
- d. Pigmen piomelanin yaitu pigmen yang berwarna hitam (Todar, 2012).

P.aeruginosa menghasilkan berbagai jenis koloni sehingga memberikan kesan biakan dari berbagai spesies bakteri. Pemiakan dari spesimen klinik biasanya menghasilkan satu atau dua tipe koloni yaitu koloni besar yang memiliki permukaan rata dan meninggi atau koloni halus dan mukoid sebagai hasil produksi berlebihan dari alginat (Todar, 2012).



Gambar 2.2 Koloni *P.aeruginosa* dari spesimen klinik
(Sumber: Todar, 2012)

Karakteristik penting lainnya dari *P. aeruginosa* dapat dilihat dari tabel berikut ini.

Tabel 2.2 Karakteristik Penting *P. aeruginosa*

Sifat	Karakteristik Penting <i>P. aeruginosa</i>
Pewarnaan gram	Gram negatif
Warna	Merah
Bentuk	Batang
Susunan	Tunggal, berpasangan, rantai pendek
Pergerakan	Motil
Pembentukan spora	Tidak membentuk spora
Hemolisis darah	Positif
Pembentukan energi	Obligat aerob
Mereduksi nitrat	Positif
Menghasilkan gas	Positif
Hidrolisis urea	Positif
Tes Katalase	Positif
Tes Oksidase	Positif
Tes fermentasi laktosa	Negatif
Tes fermentasi glukosa	Negatif

Sumber: Shodikin (2009).

2.1.3 Faktor Virulensi

P. aeruginosa memiliki struktur anatomi yang dapat membantu kolonisasi sel inang juga mampu memproduksi bahan ekstraselular yang memicu terjadinya perubahan patologis pada berbagai sel penjamunya. Faktor virulensi *P. aeruginosa* diperantai oleh berbagai hal yaitu sebagai berikut.

- a. Adhesin antara lain pili, kapsul polisakarida, dan lender alginat (biofilm).
- b. Invasin antara lain etalasa, alkali protease, sitotoksin, pigmen piosianin, dan hemolisin yang terdiri atas fosfolipase dan letinase.
- c. Toksin antara lain endotoksin (pada jaringan atau darah memicu terjadinya peradangan atau syok), eksotoksin A (meninaktifkan EF2 sehingga menghentikan sintesis protein terutama pada hati dan menyebabkan nekrosis hati), Lapisan eksopolisakarida (meningkatkan kelekatan bakteri ini terhadap epitel endotrakea dan musin yang menghambat asupan fagositik dan menyebabkan terjadinya biofilm).
- d. Antifagosit permukaan dan pertahanan terhadap reaksi bakterisid serum, antara lain kapsul dan biofilm.
- e. Pertahanan terhadap respon imun, antara lain kapsul, biofilm, dan enzim protease (Johnson *et al.*, 2011).

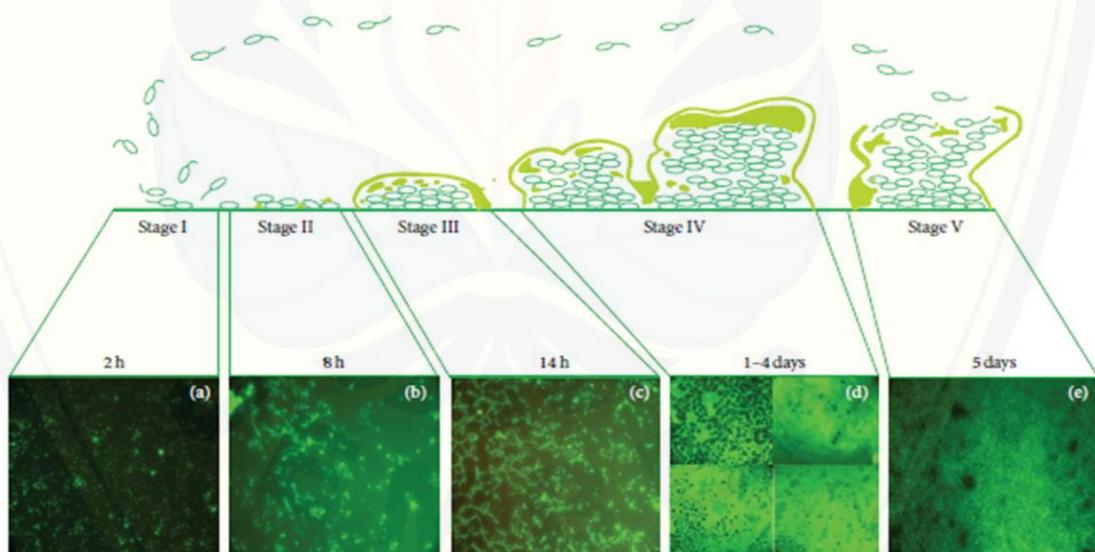
2.1.4 Biofilm

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri penghasil biofilm. Biofilm merupakan kumpulan dari sel-sel yang melekat secara ireversibel pada permukaan dan terbungkus pada matriks substansi polimer ekstraseluler (SPE) yang dihasilkan oleh bakteri tersebut serta memperlihatkan adanya perubahan fenotip seperti perubahan tingkat pertumbuhan dan perubahan transkripsi gen dari sel planktoniknya (Brooks *et al.*, 2011).

SPE dibentuk dari polisakarida, protein, lipid dan DNA ekstraseluler (eDNA) yang menempel pada sel. Selanjutnya eDNA menginisiasi penempelan

bakteri, agregasi sel, dan penguatan sel bakteri di dalam biofilm sehingga terlindung dari antibiotik. Adapun infeksi yang berhubungan dengan biofilm antara lain otitis media, prostatitis kronis akibat bakteri, periodontitis, fibrosis kistik (Brooks *et al.*, 2011).

DNA ekstraselular erat kaitannya dengan piosianin. Piosianin merupakan faktor virulensi dari *P.aeruginosa*. Piosianin berinteraksi dengan oksigen molekuler untuk membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) yaitu hidrogen peroksida. Hal itu memprakarsai keseimbangan redoks. Hidrogen peroksida tersebut mengeluarkan sinyal pembentukan eDNA yang merupakan kunci pembentukan biofilm sehingga peningkatan dan penurunan antioksidan dalam tubuh sangat berperan besar dalam pembentukan biofilm (Das dan Manefield, 2012). Tahapan perkembangan biofilm pada *P.aeruginosa* dapat dilihat pada gambar 2.2 berikut.



Gambar 2.3 Perkembangan Biofilm *P. aeruginosa*
(Sumber: Rasamirakava *et al.*, 2015)

Tahapan perkembangan biofilm *P.aeruginosa* diawali pada jam kedua setelah bakteri melekat pada permukaan abiotik. Pada tahapan kedua koloni tersebut menjadi reversibel. Tahapan ketiga biofilm yang terbentuk menjadi lebih

kokoh dan termaturasi pada tahapan ke 4. Tahapan ke 5 biofilm yang terbentuk dapat terdispersi dan mengeluarkan bakteri yang bersifat platonik (Rasamirakava *et al.*, 2015).

Salah satu contoh biofilm *P.aeruginosa* yang paling berat adalah pada pasien Fibrosis kistik (Brooks *et al.*, 2011). Pada pasien tersebut stres oksidatif yang diperantarai oleh piosianin yang mampu menurunkan level glutation yang merupakan antioksidan alami dalam tubuh (Das *et al.*, 2015).

2.1.5 Pengobatan

Infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* tidak boleh diobati dengan terapi obat tunggal karena jarang berhasil dan bakteri mudah menjadi resisten jika diterapi dengan obat tunggal. Golongan *penicillin* (*ticarcillin*, *karbenicillin* atau *piperacillin*) dapat dikombinasi dengan *aminoglycoside* (*tobramycin*, *amikacin* atau *gentamicin*), terutama dalam mengobati septikemia. Golongan *cephalosporin*, yaitu *ceftazidime* merupakan terapi primer infeksi *P. aeruginosa* dan telah terbukti efektif terhadap pasien dengan kistik fibrosis. Obat lainnya yang dapat digunakan meliputi *aztreonam*, *imipenem* dan kuinolon (Brooks *et al.*, 2011). Florokuinolon yang bekerja aktif pada *P. aeruginosa* adalah ciprofloxacin (Setiabudy, 2011).

2.2 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin merupakan senyawa flurokuinolon dengan 4-kuinolon terfloresensi. Dibanding dengan kuinolon lainnya ciprofloxacin menunjukkan perkembangan terapeutik penting karena senyawa ini memiliki aktivitas antimikroba yang lebih luas dan efektif dalam pemberian secara oral (Gilman, 2008).

2.2.1 Farmakodinamik

Enzim topoisomerase II berfungsi menimbulkan relaksasi pada DNA yang mengalami pilinan positif yang berlebihan pada waktu transkripsi dalam proses replikasi DNA bakteri. Topoisomerase IV berfungsi dalam pemisahan DNA baru setelah replikasi DNA kuman selesai. Golongan kuinolon menghambat kerja enzim tersebut pada kuman sehingga bersifat bakterisidal (Setiabudy, 2011).

Ciprofloxacin merupakan florokuinolon lama yang memiliki daya antibakteri kuat pada *P. aeruginosa*, *E.Coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *H.influenza*, *Providencia*, *Serratia*, *Salmonella*, *N. Meningitis*, *N. Gonnorrhoea*, *B. Catarrhalis* dan *Yersinea enterocolita*. Terhadap gram positif daya antibakterinya kurang baik (Setiabudy, 2011).

2.2.2 Farmakokinetik

Ciprofloxacin diabsorpsi dengan baik setelah pemberian oral dan terdistribusi secara luas di seluruh tubuh. Dosis untuk dewasa 250-750 mg tiap 12 jam. Waktu paruh dalam serum 3-5 jam. Antibiotika ini dapat ditemukan di air susu ibu. Perlu penyesuaian dosis apabila digunakan kepada pasien insufisiensi ginjal karena terjadi bersihan oleh renal namun aman digunakan oleh pasien gagal hati (Sukandar *et al.*, 2009).

2.2.3 Indikasi

Ciprofloxacin digunakan sebagai antibiotik untuk infeksi kuman gram positif dan gram negatif. sebagai profilaksis pada bedah saluran pencernaan bagian atas (Sukandar *et al.*, 2009). Aktifitas ciprofloxacin terhadap *P. aeruginosa* lebih kuat dibanding dengan flurokuinolon lainnya (Gilman, 2008).

2.2.4 Efek Samping dan Interaksi Obat

Ciprofloxacin dapat meningkatkan risiko kristaluria bila terjadi alkalinisasi urin sehingga perlu minum cukup (Sukandar *et al.*, 2009). Tidak dianjurkan untuk anak-anak karena dapat menyebabkan atropati. Namun pada anak dengan kistik fibrosis yang menggunakan ciprofloxacin menunjukkan gejala gangguan sendi yang reversibel (Gilman, 2008).

Pada pasien dengan defisiensi G6DP dapat timbul reaksi anafilaktik dalam penggunaan ciprofloxacin (Sukandar *et al.*, 2009). Reaksi merugikan yang sering muncul pada 3-17% pasien mengeluh rasa mual, muntah, atau sakit perut ringan (Gilman, 2008).

Interaksi ciprofloxacin bersama analgetika non steroid dapat meningkatkan risiko kejang sedangkan bila diberikan bersama dengan opioid dapat menurunkan kadar ciprofloxacin pada plasma. Efek antikoagulan warfarin dan nikumolon serta efek antidiabetik dari sulfonilurea dapat ditingkatkan oleh ciprofloxacin. Preparat besi oral dan sukralfat mengurangi absorpsi ciprofloxacin. Penggunaan obat ini bersama urikosuria probenisisid dapat menurunkan sekresinya (Sukandar *et al.*, 2009).

2.2.5 Sediaan

Ciprofloxacin tersedia dalam sediaan oral dengan dosis 250-750 mg. Sedangkan sediaan paraenteral intravena tersedia dalam dosis 200-400 mg (Sukandar *et al.*, 2009).

2.2.6 Resistensi

Florokuinolon khususnya ciprofloxacin biasa digunakan dalam terapi *P.aeruginosa*. Antibiotik ini berinteraksi dengan kompleks DNA target yaitu DNA girase. Empat tipe *efflux pump* obat (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, dan MexXY-OprM) dikenal sebagai faktor penyebab dari resistensi

florokuinolon. Faktor virulensi *P.aeruginosa* yaitu piosianin menyebabkan melemahnya obat-obatan flurokuinolon dengan cara membentuk biofilm (Morita *et al.*, 2014).

Piosianin merupakan faktor virulensi yang menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kenaikan piosianin pada *P. aeruginosa* terbukti menurunkan sensitivitas ciprofloxacin dengan cara menaikkan *efflux pump* obat dan meningkatkan pembentukan biofilm (Grant *et al.*, 2010).

2.3 Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat merupakan suatu ketolaktan enam karbon yang strukturnya seperti glukosa dan heksosa lain (Gilman, 2008). Vitamin larut air ini bekerja sebagai suatu koenzim dan pada keadaan tertentu merupakan reduktor dan antioksidan. Vitamin ini dapat secara langsung memberikan elektron ke enzim yang membutuhkan ion-ion tereduksi dan bekerja sebagai kofaktor untuk prolin dan lisin hidroksilase dalam biosintesis kolagen (Dewoto, 2011).

2.3.1 Farmakodinamik

Vitamin C berperan sebagai suatu kofaktor dalam sejumlah reaksi hidroksilasi dan amidasi dengan memindahkan elektron ke enzim yang ionnya harus dalam keadaan tereduksi dan dalam keadaan tertentu dapat bersifat sebagai antioksidan. Dengan demikian vitamin dibutuhkan untuk mempercepat perubahan residu prolin dan lisin pada sintesis kolagen. Selain itu juga diperlukan untuk perubahan asam folat menjadi asam folinat, metabolisme obat oleh mikrosom dan hidroksilasi dopamin menjadi norepinefrin. Vitamin C meningkatkan aktivitas enzim amidase yang berperan dalam pembentukan hormon oksitosin dan hormon antidiuretik. Selain itu vitamin C berperan dalam pembentukan steroid renal (Dewoto, 2011).

Pada jaringan, fungsi vitamin C adalah dalam sintesis kolagen, proteoglikan zat organik misalnya pada tulang, gigi, endotel kapiler. Dalam sintesis kolagen selain berperan dalam hidrosilasi prolin vitamin C juga nampaknya berperan untuk stimulasi langsung peptida kolagen. Pada pasien skorbut gangguan sintesis kolagen terlihat sebagai kesulitan penyembuhan luka selain itu juga menyebabkan gangguan pembentukan gigi dan pecahnya kapiler yang menyebabkan perdarahan seperti petekie dan ekimosis. Perdarahan terjadi disebabkan oleh adhesi sel-sel endotel yang kurang baik dan mungkin juga karena gangguan pada jaringan ikat perikapiler sehingga kapiler mudah pecah oleh penekanan (Gilman, 2008).

2.3.2 Farmakokinetik

Vitamin C mudah diabsorpsi melalui saluran cerna. Pada keadaan normal tampak kenaikan kadar vitamin C dalam darah setelah diabsorpsi. Kadar dalam leukosit dan trombosit lebih besar daripada dalam plasma dan eritrosit. Distribusinya luas ke seluruh tubuh dengan kadar tertinggi dalam kelenjar dan terendah dalam otot dan jaringan lemak. Eksresi melalui urin dalam bentuk utuh dan bentuk garam sulfatnya terjadi jika kadar dalam darah melewati ambang rangsang ginjal 1,4mg% (Dewoto, 2011).

AKG vitamin C adalah 35 mg untuk bayi dan meningkat kira-kira 50-150 mg pada dewasa. Namun diperlukan 200 mg vitamin C tiap hari agar mencapai kadar vitamin C pada plasma yang dibutuhkan untuk tersaturasi dalam sel leukosit dan untuk mencapai kadar optimal pada jaringan otot, otak, dan jantung dibutuhkan vitamin C 500 mg (Ordman, 2010). Kebutuhan vitamin C meningkat 300%-500% pada penyakit infeksi, tuberkolosis, tukak peptik, penyakit neoplasma, pasca bedah dan trauma, hipertiroid, kehamilan dan laktasi. Beberapa obat yang dapat mempercepat ekskresi vitamin C adalah tetrasiklin, fenobarbital dan salisilat (Dewoto, 2011).

Perokok diperkirakan membutuhkan vitamin C 50% untuk mempertahankan kadar normal dalam serum. Wanita yang menggunakan kontrasepsi oral juga memiliki kadar vitamin C serum yang rendah, akan tetapi pengaruh kliniknya belum diketahui. Pada masa hamil dan laktasi diperlukan tambahan vitamin C 10-25 mg perhari (Dewoto, 2011). Vitamin C banyak hilang dalam urin maka dari itu diperlukan tambahan 200mg untuk pasien yang menerima nutrisi paraenteral untuk mempertahankan konsentrasi di plasma normal yaitu 1mg/dl (60 μ M) (Gilman, 2008).

2.3.3 Indikasi

Vitamin C diindikasikan untuk pencegahan dan pengobatan skorbut. Selain itu vitamin C juga digunakan berbagai penyakit yang tidak ada hubungannya dengan defisiensi vitamin C. Karena sifat reduktornya vitamin digunakan untuk mengatasi methemoglobinemia idiopatik meskipun kurang efektif dibanding dengan *blue methylen*. Dosis yang dianjurkan minimum 150 ml (Dewoto, 2011).

Vitamin C berfungsi sebagai antioksidan yaitu dapat melindungi nitrogen monoksida dan penguraian radikal bebas. Pemberian segera 2 gram vitamin C dapat menimbulkan vasodilatasi yang tergantung pada endothelium, meurunkan kekakuan pada endotelium dan menurunkan agregasi platelet pada manusia. Asam askorbat menunjukkan perlindungan status nutrisi antioksidan menyeluruh (Gilman,2008).

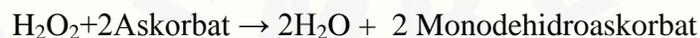
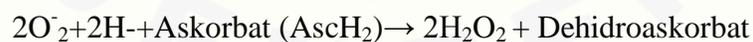
Vitamin C berfungsi tambahan pada antibiotik diteliti oleh Gebaly tahun 2010 yang menyatakan bahwa vitamin C dapat meningkatkan efek hambatan dari penempelan mikroba pada permukaan kateter hingga 100% dalam kombinasinya terhadap levofloxacin. Peningkatan pH oleh vitamin C dapat menyebabkan kematian bakteri *Escherischia coli* dalam permukaan kateter sekaligus pH yang tinggi juga dapat meningkatkan kerja levofloxacin. Pada

penelitian Abbas tahun 2012 menyatakan vitamin C dapat meningkatkan kerja antibiotik dengan konsentrasi 5-20mg/ml.

Dalam menghambat bakteri patogen yang ada di dalam mulut seperti *S. mutans*, *S. aureus*, *P.gingivalis*, *C. albicans* and *E. faecalis* vitamin C bersifat bakterisidal lebih baik dibanding klorheksidin. Konsentrasi minimum yang diperlukan vitamin C untuk menghambat bakteri tersebut adalah 10mg/ml. Vitamin C mampu memasuki sel bakteri dan mengubah reaksi reduksi oksidan melalui sifat antioksidan yang dimiliki vitamin C. Selain itu vitamin C juga menunjukkan efek antibiofilm (Isela *et al.*, 2013). Vitamin C yang ditambahkan pada isoianid menunjukkan efek bakterisidal pada strain *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap isoianid (Vilcheze *et al.*, 2013).

2.3.4 Sifat Antioksidan

Antioksidan merupakan substansi yang dapat bereaksi dengan zat yang mudah teroksidasi dengan cara menghambat atau menghentikan proses oksidasi tersebut. Vitamin C merupakan antioksidan yang ideal pada tubuh karena hanya dibutuhkan satu reduksi elektron yang rendah pada vitamin C (askorbat) untuk bereaksi pada *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yaitu *Nitrogen superoxide*, *hydroperoxyl radicals*, *aqueous peroxy radicals*, *singlet oxygen*, *ozone*, *nitrogen dioxide*, *nitroxide radicals*, dan *hypochlorous acid*. Reaksi askorbat adalah sebagai berikut:



Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas menjadi stress oksidatif. Vitamin C atau asam askorbat sebagai reduktor untuk berbagai radikal bebas. Sifat vitamin C bersifat antioksidan yang menstransfer atom H dan O_2 . Selain itu vitamin C juga menjadi

co-antioxidant pada regenerasi α -tokoferol dari tokoferol radikal (Packer *et al.*, 2002).

2.3.5 Efek Samping

Vitamin C dengan dosis lebih dari 1g/hari dapat menyebabkan diare. Hal ini terjadi karena efek iritasi langsung pada mukosa usus yang menyebabkan peningkatan peristaltik. Efek iritasi ini juga menyebabkan uretritis non spesifik terutama pada uretra distal. Dosis besar tersebut juga meningkatkan bahaya terbentuknya batu ginjal karena sebagian vitamin C di metabolisme dan dieksresi sebagai oksalat. Penggunaan kronik vitamin C dosis sangat besar dapat menyebabkan ketergantungan, sedangkan penurunan mendadak dapat menimbulkan *rebound scurvy*. Hal ini dapat dihindari dengan penurunan vitamin secara bertahap. Vitamin C paranteral dosis tinggi dapat menyebabkan oksalosis berat, aritmia jantung, dan kerusakan ginjal berat (Dewoto, 2011).

Vitamin C meningkatkan absorpsi besi, sehingga dosis besar dapat berbahaya bagi pasien hemokromatosis, talasemia atau anemia sideroblastik. Hemolisis ringan dilaporkan terjadi pada pasien defisiensi G6PD. Hemolisis akut dapat meningkatkan koagulasi intravaskuler diseminata dan gagal ginjal akut yang dapat menyebabkan kematian. Vitamin C mega dosis juga mengakibatkan krisis *sickle cell* (Dewoto, 2011).

2.3.6 Sediaan

Vitamin C terdapat dalam berbagai preparat baik tablet 50-1500 mg maupun dalam bentuk larutan. Kebanyakan sediaan multivitamin mengandung vitamin C. Untuk sediaan suntik didapatkan larutan vitamin C 100-500 mg. Air jeruk mengandung vitamin C yang tinggi sehingga dapat menggantikan vitamin C sebagai sediaan terapi. Kalsium askorbat dan natrium ascorbat didapatkan dalam bentuk bubuk untuk peroral (Dewoto, 2011).

2.4 Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

2.4.1 Metode difusi

Metode difusi antara lain:

- a. Metode *disc diffusion (tes Kirby & Bauer)* menggunakan piringan yang berisi agen antimikroba, kemudian diletakan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan oleh agen antimikroba pada permukaan media agar.
- b. Metode *E-test* digunakan untuk mengestimasi Kadar Hambat Minimum (KHM), yaitu konsentrasi minimum suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah sampai tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme sebelumnya. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkannya yang menunjukkan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar.
- c. *Ditch-plate technique*. Pada metode ini sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba tersebut.
- d. *Cup-plate technique*. Metode ini serupa dengan disk diffusion, di mana dibuat sumuran pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji (Pratiwi, 2008).

2.4.2 Metode Dilusi

Metode dilusi antara lain:

- a. Metode dilusi cair/ *broth dilution test (serial dilution)*. Metode ini digunakan untuk mengukur Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM.
- b. Metode dilusi padat (*solid dilution test*). Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008).

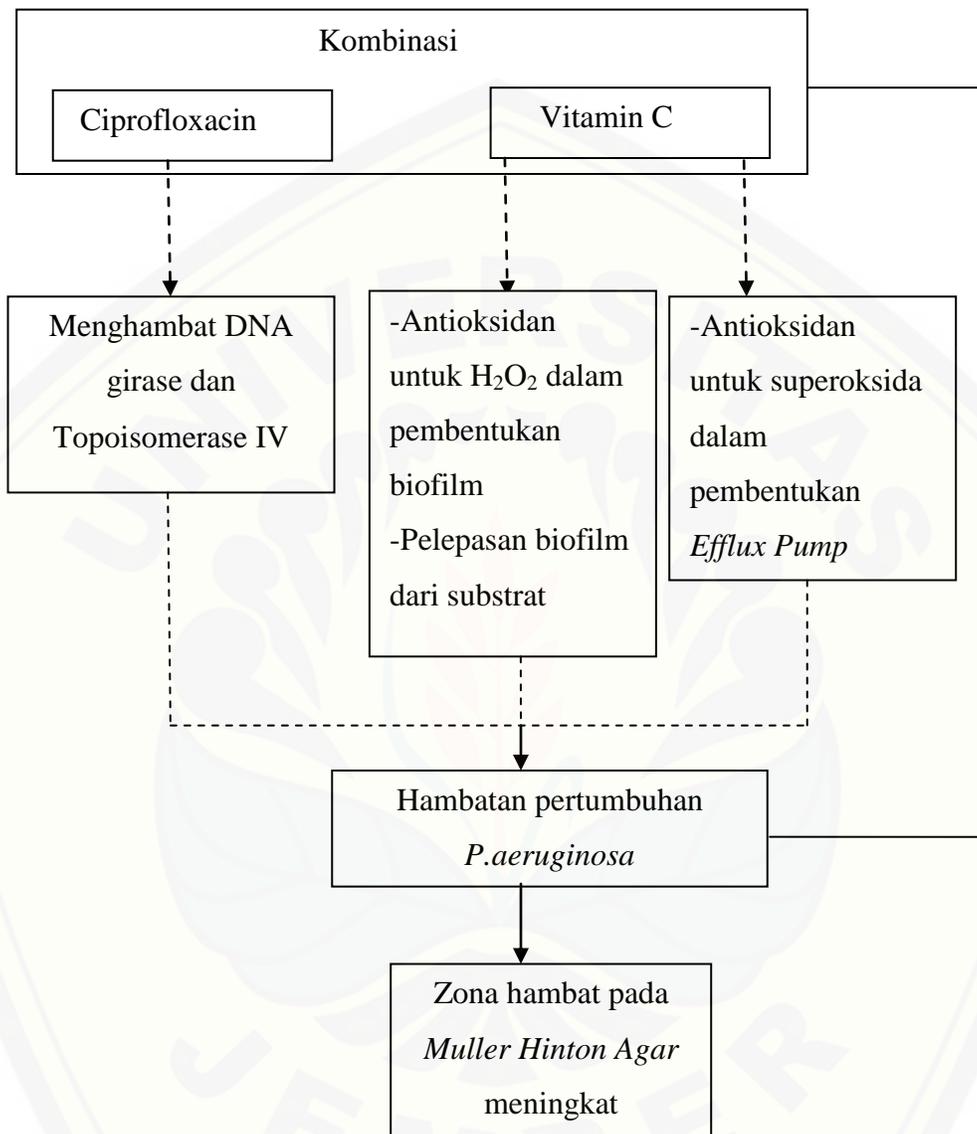
2.5 Kombinasi Obat

Kombinasi obat adalah penggunaan lebih dari satu obat dalam waktu bersamaan. Kombinasi obat tidak jarang digunakan pada terapi AIDS, kanker, dan penyakit infeksi. Fungsi kombinasi obat adalah untuk:

- a. meningkatkan efek terapi
- b. menurunkan dosis untuk mendapatkan efek terapi yang tetap sehingga efek toksik menurun
- c. menurunkan dan memperlambat pembentukan resistensi obat
- d. Membentuk sinergitas selektif antara target (efikasi sinergis) dan host (toksik antagonis)

Sifat yang terjadi dari lebih dari satu obat yang dikombinasikan adalah sinergis, antagonis, atau adiktif. Suatu kombinasi obat disebut sinergis apabila kombinasi lebih dari satu obat tersebut memiliki target yang sama, secara aritmatik hubungan kombinasi obat A dan obat B disebut sinergis apabila $A+B=4$. Kombinasi adiktif apabila $A+B=2$ sedangkan kombinasi antagonis terjadi apabila $A+B \leq 1$. Selain itu kombinasi obat dapat membentuk efek potensiasi yaitu kondisi satu atau dua obat yang dikombinasikan tidak memiliki efek apabila diberikan secara terpisah namun dapat meningkat efek pada obat lainnya. Efek potensiasi tersebut disebut juga dengan efek meningkatkan (*enhancement*) (Chou, 2006).

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.4 Skema konseptual

Keterangan :

—→ : diteliti

----- : tidak diteliti

P. aeruginosa merupakan bakteri yang dalam replikasinya membutuhkan enzim DNA girase dan Topoisomerase IV serta memiliki biofilm dan *efflux pump* yang dapat menyebabkan bakteri lebih bertahan dalam stress pada lingkungan. Pada *P.aeruginosa*, biofilm dihasilkan oleh piosianin yang bersama dengan oksigen molekuler dapat menghasilkan ROS yaitu H₂O₂ dan Superoksida. H₂O₂ menginisiasi terbentuknya eDNA yang merupakan kunci dalam pembentukan biofilm sedangkan *efflux pump* dihasilkan oleh superoksida yang dapat menyebabkan penyimpangan protein pengenalan antibiotik. Adanya vitamin C sebagai antioksidan dapat mencegah terjadinya oksidasi ROS tersebut sehingga dapat mencegah terbentuknya biofilm dan *efflux pump*. Vitamin C juga dapat merusak biofilm dengan cara melepaskan ikatan biofilm dari substratnya. Dalam penelitian ini kombinasi ciprofloxacin dan vitamin C bekerja untuk menghambat DNA girase dan Topoisomerase IV serta biofilm dan *efflux pump* yang ditunjukkan dengan pertumbuhan *P.aeruginosa* yang menurun. Penurunan pertumbuhan *P.aeruginosa* ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat pada Media *Mueller Hinton Agar*.

2.7 Hipotesis Penelitian

- a. Penambahan vitamin C terhadap aktivitas ciprofloxacin memiliki efek meningkatkan penghambatan pertumbuhan *P. aeruginosa* secara *in vitro*.
- b. Konsentrasi minimum vitamin C yang dapat mempengaruhi aktivitas ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa* adalah 1,25-2,5 mg/ml.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian semu (*Quasi Experimental Design*) laboratorium. Dalam penelitian ini tidak dilakukan randomisasi subyek karena semua sampel telah homogen (Pratikya, 2008).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan eksperimental sederhana (*Post test Only Control Grup Design*). Dalam rancangan penelitian ini sampel dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yaitu 5 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol (negatif dan positif). Untuk melakukan pengulangan dalam suatu percobaan dapat digunakan rumus Federer (Hanafiah, 2003):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

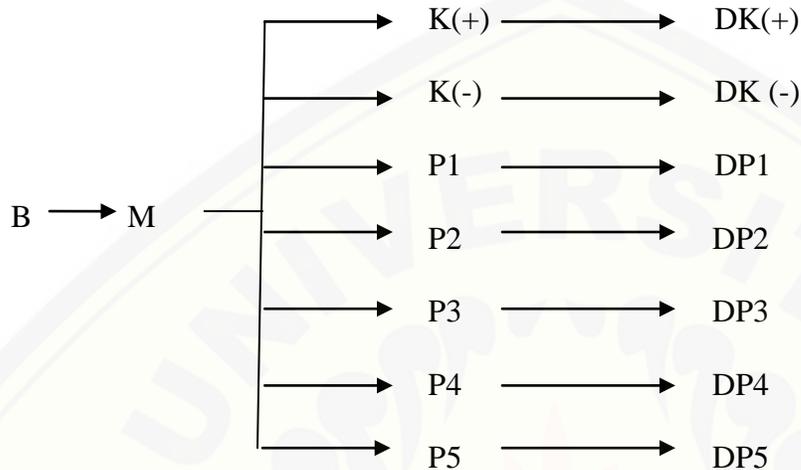
$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15$$

$$r \geq 3,5$$

sehingga pengulangan yang dilakukan sebanyak 4 kali

Rancangan penelitian dan pengulangan dapat dilihat pada gambar 3.1



Keterangan :

B : Bakteri *P. aeruginosa*

M : Media *Mueller Hinton Agar*

K (-) : Kontrol negatif yaitu bakteri *P.aeruginosa* + *Aquabidest* 5 μ g

K(+): Bakteri *P.aeruginosa* + ciprofloxacin

P1 : Bakteri *P.aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 2,5 mg/ml

P2 : Bakteri *P.aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 5 mg/ml

P3 : Bakteri *P.aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 10 mg/ml

P4 : Bakteri *P.aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 20 mg/ml

P5 : Bakteri *P.aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 40 mg/ml

DK (-):Data perlakuan kontrol negatif yaitu bakteri *P.Aeruginosa* + *Aquabidest*

DK(+):Data perlakuan kontrol positif bakteri *P.Aeruginosa* + ciprofloxacin

DP1 : Data perlakuan bakteri *P.Aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 2,5 mg/ml

DP2 : Data perlakuan bakteri *P.Aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 5 mg/ml

DP3 : Data perlakuan bakteri *P.Aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 10 mg/ml

DP4 : Data perlakuan bakteri *P.Aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 20 mg/ml

DP5 : Data perlakuan bakteri *P.Aeruginosa* + ciprofloxacin + Vitamin C 40 mg/ml

Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada bulan November-Desember 2015. Penelitian ini terdiri

atas metode subkultur *Pseudomonas aeruginosa* dan tes kombinasi menggunakan *disc diffusion test*. Metode ini paling baik jika digunakan sebagai *screening* aktivitas antibakteri dan paling efisien dalam segi biaya (Mahon *et al.*, 2015).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi vitamin C dengan berbagai konsentrasi.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penghambatan pertumbuhan *P.aeruginosa* pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang dihitung dari diameter zona hambat bakteri.

3.4.3 Variabel terkontrol

Variabel kendali penelitian ini meliputi:

- a. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- b. Penghitungan konsentrasi obat.
- c. Lama inkubasi dan suhu inkubator.
- d. Cara perhitungan zona hambat.
- e. Konsentrasi ciprofloxacin

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.5.2 Pertumbuhan bakteri

Pertumbuhan bakteri yang dimaksud pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni *P.aeruginosa* pada media MHA. Pertumbuhan bakteri ini dihambat dengan cakram antibiotik ciprofloxacin dan cakram kombinasi ciprofloxacin dan vitamin C yang ditunjukkan dengan zona bening di sekitar cakram.

3.5.3 Ciprofloxacin

Antibiotik yang digunakan adalah ciprofloxacin generik yang diberikan dalam konsentrasi yang sama pada setiap kelompok perlakuan yaitu 500 mg. Antibiotik akan disiapkan menjadi larutan antibiotik dengan menggunakan *aquabidest* dengan konsentrasi sama tiap perlakuan yaitu 5µg/5µl.

3.5.4 Vitamin C

Vitamin C yang digunakan adalah vitamin C dengan merk dagang IPI vitamin C tablet 50 mg. Vitamin C diberikan berbeda pada setiap kelompok perlakuan. Konsentrasi yang digunakan adalah 2,5mg/ml; 5mg/ml; 10mg/ml; 20 mg/ml; dan 40mg/ml.

3.5.5 Kombinasi ciprofloxacin dan vitamin C

Kombinasi ciprofloxacin dengan konsentrasi 1 mg/ml dan vitamin C dan vitamin C berbagai konsentrasi konsentrasi 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml dan 40 mg/ml dengan dicampur pada sebuah vial dan diteteskan pada cakram kosong sebanyak 10 µl pada setiap perlakuan.

3.5.6 Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat menunjukkan terhambatnya pertumbuhan koloni dari bakteri yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media. Diameter zona hambat setiap perlakuan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Jangka sorong diletakkan di bagian dasar cawan dan diukur sesuai diameter zona hambat.

Apabila pada hasil tidak terbentuk zona yang bulat sempurna maka zona hambat diukur sebanyak 3 kali pada sisi yang berbeda kemudian di hitung nilai rata-rata.

3.5.7. Uji Sensitifitas

Uji sensitifitas adalah tes yang digunakan untuk menguji kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Uji sensitifitas bertujuan untuk mengetahui sensitifitas bakteri dalam merespon antibiotik. Uji sensitifitas yang digunakan adalah metode *disc diffusion* dengan melihat kadar hambat berupa zona bening pada media.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca, autoklaf, sterilisator, vortex, inkubator, cawan petri, vial, tabung reaksi, mortar, ose, kapas lidi, spuit, kertas label, korek, gunting, kapas, *paper holer*.

3.6.2 Bahan

Nutrient agar, Ciprofloxacin 500 mg, Vitamin C 50 mg, *muller hinton agar* (MHA), *nutrient agar*, *aquabidest*, *whatman filter paper*.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Alat

Cakram kosong dibuat dari *Whatmann filter paper* yang dibentuk dengan pelubang kertas sehingga membentuk kertas cakram berukuran 5mm . Alat-alat yang akan digunakan dan cakram kosong disterilkan dalam sterilisator panas kering selama 15 menit dengan suhu 110°C. (Suswati dan Mufida, 2009)

3.7.2 Pembuatan Media *Nutrient Agar* dan Peremajaan Bakteri

Media yang digunakan dalam bentuk serbuk yang telah tersedia dalam kemasan, selanjutnya ditimbang sesuai kebutuhan. Serbuk dilarutkan dalam aquades dan cara pembuatannya disesuaikan dengan petunjuk pada kemasan. Kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 20 menit. Setelah 20 menit dinginkan sampai suhu 60° C. Selanjutnya media dituangkan tadi ke dalam cawan petri. Peremajaan bakteri *P. aeruginosa* dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri tersebut pada *nutrient agar* (CLSI, 2012).

3.7.3 Pembuatan Media *Mueller hinton agar*

Media *Mueller hinton agar* (MHA) yang digunakan dalam bentuk serbuk yang telah tersedia dalam kemasan. Jumlah serbuk yang ditimbang disesuaikan dengan kebutuhan. Serbuk ditimbang seberat 34 gram kemudian dicampur dengan aquades sebanyak 1 liter. Larutan tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya larutan yang telah steril dituangkan dalam cawan petri dan didiamkan pada suhu kamar hingga padat (Suswati dan Mufida, 2009).

3.7.4 Pembuatan larutan antibiotik ciprofloxacin dan vitamin C

- a. Pembuatan larutan ciprofloxacin dibutuhkan *aquabidest* sebagai pelarut. Ciprofloxacin 500 mg dilarutkan dengan cara digerus halus dan dilarutkan dalam 10 ml *aquabidest* selanjutnya dilarutkan serial hingga mendapat konsentrasi 1mg/ml. Konsentrasi tersebut diambil 5µl menggunakan mikropipet sehingga potensi yang didapatkan 5µg/5µl.
- b. Pembuatan larutan vitamin C dibutuhkan pelarut *aquabidest*. Vitamin C disiapkan dalam bentuk serbuk 200 mg dari 4 tablet vitamin C 50 mg. Selanjutnya diencerkan dengan *aquabidest* 100ml, lalu dibuat seri pengenceran hingga

memperoleh konsentrasi sebagai berikut: 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml dan 40 mg/ml. kemudian 1 ml larutan vitamin C dicampur dengan ciprofloxacin 1mg/ml (CLSI,2012).

3.7.5 Pembuatan cakram berisi larutan

- a. Cakram kontrol positif dibuat dari cakram kosong yang ditetesi ciprofloxacin 5µg/5µl hingga kering.
- b. Cakram perlakuan dibuat dari campuran ciprofloxacin dan vitamin C berbagai konsentrasi yang diambil sebanyak 10 µl. Larutan tersebut ditetaskan pada cakram hingga kering.
- c. Cakram kontrol negatif dibuat dari *aquabidest* 10µl yang ditetaskan pada cakram hingga kering (CLSI,2012).

3.7.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

Koloni dipindahkan dengan menggunakan ose dari media *nutrient agar* ke *aquabidest* steril. Densitas dari suspensi bakteri tersebut harus sesuai dengan 0.5 *Mc Farland standard*. Jika tidak sesuai maka diatur dengan menambahkan aquades atau menambahkan koloni bakteri, kemudian divortex agar sama dengan larutan standar 0.5 *Mc Farland*. Penyesuaian larutan standar 0.5 *Mc Farland* dan suspensi bakteri dilakukan dengan cara membandingkan kekeruhannya dengan pada kertas berlatar belakang putih dan memiliki garis hitam (CLSI, 2012).

3.7.7 Inokulasi bakteri

Bakteri dioleskan pada media *Mueller hinton agar* dalam cawan petri menggunakan kapas lidi steril sebanyak 4 kali (Ortez, 2005)

3.7.8 Inkubasi

Cakram ditempelkan secara kuat pada permukaan media MHA yang telah diolesi bakteri *P. aeruginosa*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-20 jam (Mahon *et al.*, 2015).

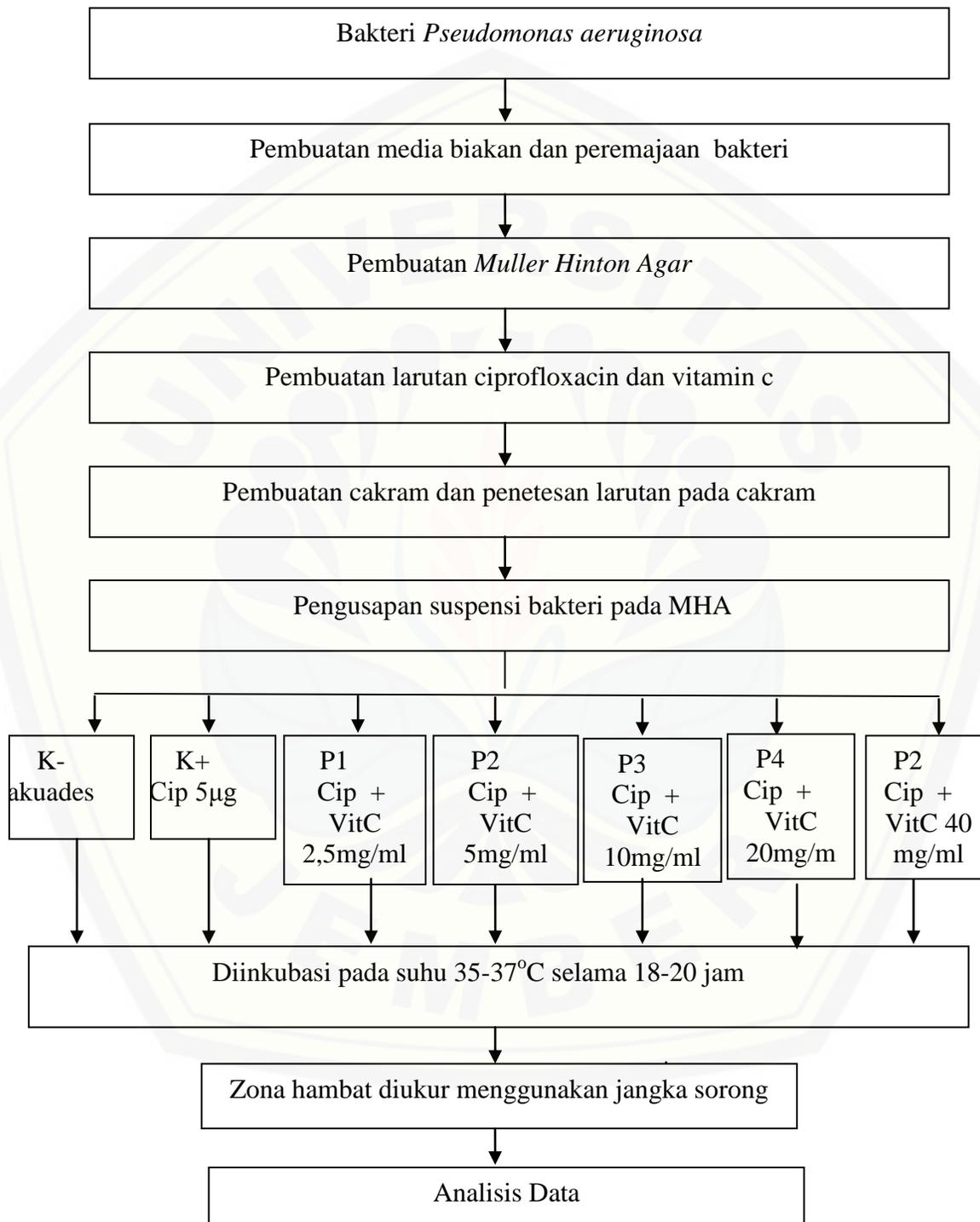
3.7.9 Pengamatan

Tahap pengamatan antimikroba ini dilakukan dengan menghitung zona hambat pertumbuhan masing-masing zona hambat yang tumbuh disekitar cakram. Perhitungan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat pertumbuhan *P. aeruginosa* pada media MHA dengan menggunakan jangka sorong (Mahon *et al.*, 2015).

3.8 Analisis Data

Data penelitian diperoleh dari pengukuran diameter zona hambat pada media. Analisis data dilakukan dengan menggunakan beberapa uji analisis. Pertama dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Selanjutnya untuk mengetahui distribusi data yang dibandingkan mempunyai varian yang sama atau tidak (uji homogenitas) digunakan uji varian *Levene's*. Jika varian data yang diuji sama, maka data tersebut dapat dianalisis lebih lanjut dengan uji korelasi bivariat *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat. Selanjutnya dilakukan regresi logaritmik untuk mendapatkan persamaan yang digunakan untuk mencari konsentrasi vitamin C minimum yang dapat mempengaruhi sensitivitas ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *P.aeruginosa*. Uji beda yang dilakukan adalah *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Test* (Dahlan, 2009).

3.9 Alur Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

3.10 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini telah disetujui Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada tanggal 23 November 2015 dengan surat nomor 678/H25.1.11/KE/2015 (Lampiran A). Tanggapan yang tercantum yaitu untuk memperhatikan pembuangan limbah dan kontrol kualitas mikrobiologi.

