

## **EMERGENCE RESISTANT UROPATOGEN *Escherichia coli* SETELAH PEMBERIAN Siprofloksasin DAN $\alpha$ -MANGOSTIN SECARA *in vitro***

Maya Dian Rakhmawatie<sup>1</sup>, Afiana Rohmani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Semarang  
[mavapriambodo83@gmail.com](mailto:mavapriambodo83@gmail.com)

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Semarang  
[afi.darwis@yahoo.com](mailto:afi.darwis@yahoo.com)

### **ABSTRACT**

*Emergence resistant on uropatogen Escherichia coli can occur shortly after the start of therapy using subtherapeutic doses of ciprofloxacin. Ciprofloxacin is an antibiotic that works depends on the level of concentration, higher ratio  $C_{max} / MIC$  will give increases in effectiveness. When the ratio of  $C_{max} / MIC < 1$ , then the risk of emergence resistant will be increased. One of the herbs that are abundant in Indonesia and has anti-bacterial activity is mangosteen (*Garcinia mangostana L.*), which has an active compound  $\alpha$ -mangostin. Administration of the active compound  $\alpha$ -mangostin is expected to help prevent the emergence resistant of uropatogen *E. coli* due to the use of subtherapeutic ciprofloxacin. This research was conducted by giving treatment to uropatogen *E. coli* in vitro. Bacterial strains used are uropatogen *E. coli* resistant to ciprofloxacin with MIC values of 128  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Treatment is divided into (I) treatment groups using ciprofloxacin concentration  $C_{max}$  at a dose of 750 mg (4.3  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), (II) treatment groups using ciprofloxacin concentration of 4.3  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and  $\alpha$ -mangostin 0.18  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , and (III) the negative control group. The study states that the administration of the combination of  $\alpha$ -mangostin and ciprofloxacin delayed the growth of uropatogen *E. coli* resistant strains (MIC value of 128  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) compared to administration of ciprofloxacin alone ( $p < 0.000$ ). But the combination of  $\alpha$ -mangostin and ciprofloxacin can not prevent an increased in resistance strain uropatogen *E. coli*, which is characterized by an increased in the value of the MIC to be 256  $\mu\text{g} / \text{mL}$  after 2 hours of treatment.*

*Keywords: ciprofloxacin, resistance,  $\alpha$ -mangostin, uropatogen *E. coli**

### **PENDAHULUAN**

Resistensi bakteri terhadap berbagai golongan antibiotika meningkat, sementara pengembangan antibiotika terkendala waktu dan biaya yang besar. Oleh karena itu, untuk mengurangi kejadian resistensi diperlukan optimalisasi penggunaan antibiotika yang tersedia (Drussano, 2007)<sup>1</sup>. Resistensi juga terjadi pada siprofloksasin yang digunakan untuk pengobatan infeksi saluran kemih (ISK), suatu infeksi yang cukup banyak diderita oleh manusia. Menurut Mandal *et al.* (2012), persentase resistansi *Escherichia coli* (*E. coli*) pada pasien ISK terhadap siprofloksasin telah mencapai 73,04%<sup>2</sup>.

Resistensi dapat terjadi sesaat setelah dimulainya terapi menggunakan dosis subterapeutik. Peningkatan jumlah mutan

resisten dapat terjadi secara bertahap selama berlangsungnya proses terapi (Smirnova *et al.*, 2009)<sup>3</sup>. Resistensi yang terjadi akibat penggunaan dosis terapeutik dapat dikategorikan sebagai *emergence resistant*. Pelaquin *et al.* (1989) menyebutkan kejadian *emergence resistance* sebesar 80% pada terapi Gram – basil menggunakan siprofloksasin rasio  $C_{max}/MIC < 8$  atau rasio  $AUC_{0-24}/MIC < 100$ . Jika rasio  $C_{max}/MIC > 8$  atau rasio  $AUC_{0-24}/MIC \geq 100$ , kejadian *emergence resistance* dapat dicegah 8 kalinya, menjadi 10% dari keseluruhan terapi<sup>4</sup>. Kejadian *emergence resistance* tersebut merupakan faktor penting yang dapat menyebabkan kegagalan terapi klinik.

Berbagai usaha untuk memaksimalkan penggunaan antibiotika telah dilakukan,

termasuk mengoptimalkan parameter farmakokinetika / farmakodinamika (PK/PD) dari masing-masing antibiotika tersebut (Gloede *et al.*, 2010)<sup>5</sup>. Namun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa optimalisasi parameter PK/PD tidak sepenuhnya dapat mengurangi kejadian resistensi antibiotika. Penelitian Rakhmawatie (2012) yang menggunakan model simulasi kinetika *in vitro*, melihat pengaruh dosis siprofloksasin terhadap resistensi bakteri uropatogen *E. coli*. Hasil penelitian menunjukkan setelah perlakuan 3 hari, kedua kelompok dosis yaitu 500 mg dan 750 mg, membentuk bakteri uropatogen *E. coli* yang resisten<sup>6</sup>.

Eradikasi dan terbentuknya bakteri *E. coli* yang resisten selain dipengaruhi oleh dosis siprofloksasin yang diberikan juga dipengaruhi nilai MIC awal dari bakteri *E. coli*. Hal tersebut disebabkan karena aksi farmakologi siprofloksasin tergantung pada parameter PK/PD  $AUC_{0-24}/MIC$  dan  $C_{max}/MIC$ . Semakin tinggi dosis siprofloksasin yang digunakan akan meningkatkan nilai parameter  $AUC_{0-24}/MIC$  dan atau rasio  $C_{max}/MIC$ . Suatu hasil penelitian menunjukkan angka rasio  $AUC_{0-24}/MIC$  melebihi 250 dapat mengeliminasi Gram – basil dengan sangat cepat (Craig, 2001)<sup>7</sup>. Oleh karena itu, untuk eradikasi optimal dibutuhkan dosis siprofloksasin yang semakin besar serta nilai MIC bakteri *E. coli* yang semakin kecil (Olofsson *et al.*, 2007)<sup>8</sup>.

Pada saat ini mulai dikembangkan penggunaan bahan alam atau isolat herbal untuk menunjang pengobatan bahan kimia. Salah satu herbal yang banyak didapatkan di Indonesia dan mempunyai aktivitas anti bakteri adalah tanaman manggis (*Garcinia mangostana L.*). Zat pada tanaman manggis yang mempunyai efek farmakologis sebagai anti bakteri adalah alfa mangostin. Pemanfaatan tanaman manggis dapat diperoleh dari buah, daun, batang pohon, serta kulit buahnya (Chaverri *et al.*, 2008)<sup>9</sup>.

Resistensi bakteri terhadap fluorokuinolon terkait dengan regulatori gen yang mempengaruhi permeabilitas

fluorokuinolon masuk ke dalam sel bakteri (Allou *et al.*, 2009)<sup>10</sup>. Efek alfa mangostin sendiri adalah bakterisida dengan mekanisme aksi merusak integritas membran sitoplasma bakteri sehingga komponen intrasel bakteri keluar. Aktivitas tersebut tergantung dosis (Koh *et al.*, 2013)<sup>11</sup>. Oleh karena itu, diharapkan alfa mangostin dapat mencegah resistensi dengan cara meningkatkan masuknya antibiotika siprofloksasin ke dalam sel bakteri. Berdasarkan uraian di atas, dapat dirumuskan masalah apakah pemberian alfa mangostin dapat bermanfaat untuk membantu aksi farmakologis siprofloksasin dalam hal eradikasi dan pencegahan timbulnya bakteri uropatogen *E. coli* resisten.

## METODE PENELITIAN

### Rancangan dan sampel penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan rancangan *pre and post treatment*. Populasi penelitian adalah uropatogen *E. coli* yang didapatkan dari isolat pasien ISK RS Roemani Muhammadiyah Semarang. Sampel penelitian adalah kelompok uropatogen *E. coli* strain resisten terhadap siprofloksasin. Penilaian kategori kerentanan *E. coli* mengacu pada EUCAST (2012), yaitu kategori rentan dengan nilai  $MIC \leq 0,5$  mg/L, strain *E. coli* intermediat dengan nilai MIC 0,5 – 1 mg/L, dan strain *E. coli* resisten dengan nilai  $MIC > 1$  mg/L<sup>12</sup>.

### Cara penelitian

Isolat uropatogen *E. coli* didapatkan dari sampel urin pasien ISK. Pengambilan sampel urin dilakukan setiap hari, meskipun tidak selalu mendapatkan sampel urin pada saat pengambilan. Sampel urin yang didapatkan dibiakkan terlebih dahulu pada media agar MacConkey kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 20 – 24 jam. Bakteri yang tumbuh pada media agar MacConkey kemudian dibiakkan pada media agar Eosin Methylene Blue (EMB) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 20 – 24 jam. Hasil positif uropatogen *E. coli*, yang ditandai dengan warna hijau metalik pada media EMB

(Oxoid, 2010)<sup>13</sup>, kemudian dimurnikan dengan cara dibiakkan kembali dalam media agar MacConkey.

**a.** Penetapan kadar MIC uropatogen *E. coli* sebelum perlakuan.

Penetapan kadar MIC terhadap uropatogen *E. coli* hasil isolat klinik sampel urin dilakukan sebelum perlakuan. Rentang kadar siprofloksasin yang digunakan untuk uji MIC uropatogen *E. coli* terhadap siprofloksasin adalah 0,004 hingga 256 µg/mL, ditambah kontrol negatif berisi siprofloksasin dosis terendah pengenceran dan media MHB. Kadar siprofloksasin tertinggi 256 µg/mL didapatkan dengan mengencerkan 1,0 mL siprofloksasin kadar 512 µg/mL dengan 1,0 mL MHB yang berisi uropatogen *E. coli* yang akan diuji. Kadar 256 µg/mL kemudian diencerkan bertahap hingga kadar 0,004 µg/mL. Uji penetapan MIC dilakukan pada sampel dilakukan replikasi 3 hingga 4 kali menggunakan daerah koloni yang berbeda dalam setiap cawan petri. Hal tersebut dimaksudkan untuk menghindari interpretasi nilai MIC pada koloni varian atipikal. Jumlah bakteri untuk uji MIC menggunakan metode makrodilusi MHB adalah inokulum  $2 \times 10^5$  cfu/mL. Inkubasi pada uji MIC dilakukan pada suhu 37°C selama 18-20 jam (CLSI, 2012)<sup>14</sup>.

**b.** Perlakuan pada uropatogen *E. coli*.

Bakteri strain uropatogen *E. coli* kemudian diberi perlakuan, yaitu (I) kelompok perlakuan menggunakan kadar siprofloksasin  $C_{max}$  pada dosis 750 mg, (II) kelompok perlakuan menggunakan kadar siprofloksasin  $C_{max}$  pada dosis 750 mg dan alfa mangostin, dan (III) kelompok kontrol negatif (skema alur penelitian pada gambar 1).

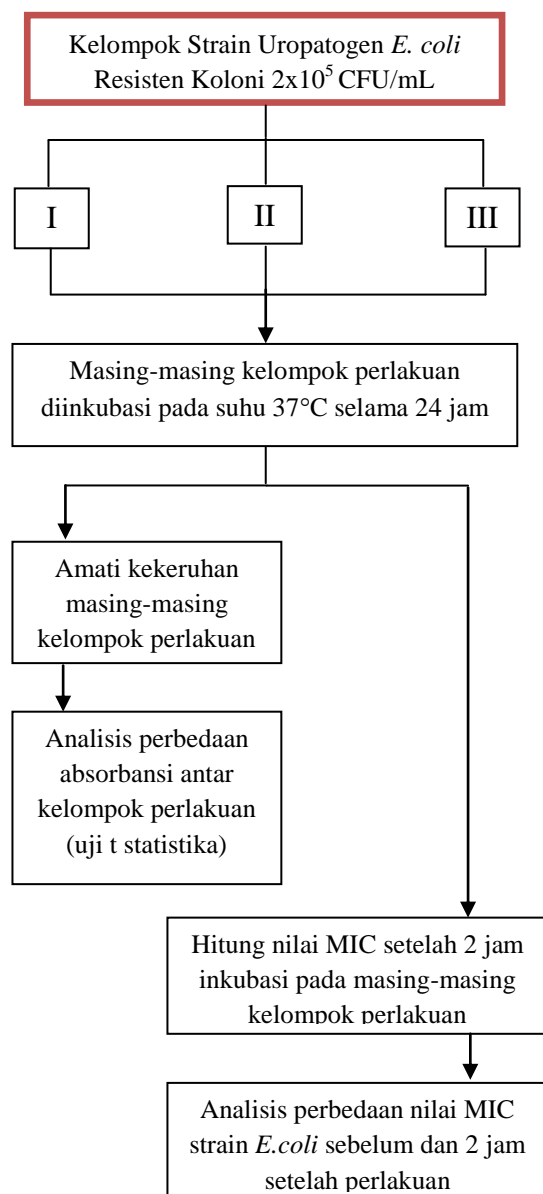
Pemberian dosis alfa mangostin berdasar pada profil kadar maksimal dalam darah setelah pemberian jus manggis 60 mL per hari (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2012). Penelitian tersebut menyatakan bahwa 60 mL jus manggis menyediakan  $\pm 3,07$  mmol/L  $\alpha$ -mangostin. Kadar maksimal dalam  $\alpha$ -mangostin dalam darah dicapai pada waktu

$3,7 \pm 2,4$  jam dengan kadar maksimal pada salah satu subyek penelitian sebesar 450 nmol/L atau setara dengan kadar 0,18 µg/mL<sup>15</sup>. Kadar tersebut yang digunakan sebagai acuan kelompok perlakuan (III) dan (IV). Kadar siprofloksasin perlakuan berdasar pada kadar maksimal siprofloksasin dalam darah setelah pemberian dosis siprofloksasin 750 mg, yaitu 4,3 µg/mL (FDA, 2011)<sup>16</sup>.

Setiap kelompok perlakuan pada semua strain uropatogen *E. coli* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jumlah koloni awal bakteri yang diinginkan sebelum perlakuan adalah  $2 \times 10^5$  CFU/mL. Jumlah koloni tersebut berdasarkan pada patogenesis ISK, yaitu jumlah minimal bakteri untuk menimbulkan gejala bakteriuria.

Setelah 2 jam inkubasi pertama, kemudian dilakukan prosedur penetapan nilai MIC. Penetapan kadar MIC terhadap uropatogen *E. coli* hasil isolat klinik sampel urin setelah perlakuan dilakukan untuk melihat ada atau tidak kenaikan nilai MIC dibandingkan awal sebelum perlakuan. Perubahan nilai MIC yang meningkat dari nilai awal akan dikategorikan menjadi peningkatan resistensi uropatogen *E. coli* setelah perlakuan.

Setelah 24 jam perlakuan dan diinkubasi pada suhu 37° C, kemudian sampel diukur tingkat kekeruhan pertumbuhan bakterinya. Tingkat kekeruhan bakteri diukur dengan membaca absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 625 nm.



Gambar 1. Skema alur perlakuan I, II, dan III pada masing-masing kelompok strain bakteri uropatogen *E. coli* strain resisten (Ket. (I) Siprofloksasin dosis 750 mg, (II) Siprofloksasin dosis 750 mg dan alfa mangostin, dan (III) Kontrol negatif).

### c. Pengolahan dan analisis data

Adanya peningkatan resistensi bakteri uropatogen *E. coli* dilihat menggunakan kenaikan nilai MIC bakteri terhadap siprofloksasin. Nilai MIC bakteri uropatogen *E. coli* setelah perlakuan dibandingkan dengan nilai MIC bakteri uropatogen *E. coli* sebelum perlakuan. Efek jangka panjang dari kombinasi  $\alpha$ -mangostin dan siprofloksasin

dilihat dari kekeruhan sampel setelah 24 jam perlakuan dan inkubasi. Perbedaan efek tiap perlakuan dianalisis untuk melihat pengaruh dosis siprofloksasin dan atau diberikan secara kombinasi dengan  $\alpha$ -mangostin pada strain uropatogen *E. coli* resisten. Data di analisis dengan menggunakan uji t statistik.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penetapan kadar MIC uropatogen *E. coli* sebelum perlakuan.

Penetapan MIC uropatogen *E. coli* di awal sebelum perlakuan dilakukan untuk menentukan nilai MIC dan kategori kerentanan uropatogen *E. coli* yang akan digunakan dalam penelitian. Penilaian kategori kerentanan *E. coli* mengacu pada EUCAST (2012), yaitu kategori rentan dengan nilai MIC  $\leq 0,5$  mg/L, strain *E. coli* intermediet dengan nilai MIC 0,5 – 1 mg/L, dan strain *E. coli* resisten dengan nilai MIC  $> 1$  mg/L<sup>12</sup>.

Nilai MIC sendiri dapat ditetapkan dengan beberapa macam metode seperti metode difusi cakram atau makrodilusi menggunakan media cair (*broth*). Karena pada penelitian diinginkan hasil nilai MIC dalam satuan  $\mu\text{g/mL}$ , maka dalam penelitian ini dilakukan uji MIC dengan metode makrodilusi menggunakan media cair. Metode makrodilusi ini memiliki kelebihan lebih murah dan memiliki standar breakpoint dalam lembaga mikrobiologi seperti CLSI atau BSAC. Namun kelemahannya adalah interpretasi manual dan waktu tunggu inkubasi 18-24 jam (Lacy *et al.*, 2004)<sup>17</sup>.

Hasil penetapan kadar MIC awal pada uropatogen *E. coli* yang digunakan terlihat pada tabel 1, termasuk dalam kategori resisten dengan nilai MIC 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabel 1. Hasil penetapan nilai MIC uropatogen *E. coli* terhadap siprofloksasin

Kode*/K adar µg/mL	25	12	6	3	1	8	Kontr ol Nega tif
I	-	-	+	+	+	+	-
II	-	-	+	+	+	+	-
II	-	-	+	+	+	+	-

Keterangan \*Jumlah replikasi penetapan MIC

### Penetapan kadar MIC uropatogen *E. coli* 2 jam setelah perlakuan.

Penetapan kadar MIC terhadap uropatogen *E. coli* hasil isolat klinik sampel urin setelah perlakuan dilakukan untuk melihat ada atau tidak kenaikan nilai MIC dibandingkan awal sebelum perlakuan. Perubahan nilai MIC yang meningkat dari nilai awal akan dikategorikan menjadi peningkatan resistensi uropatogen *E. coli* setelah perlakuan. Meskipun bukan prediktor resistensi yang baik, kenaikan MIC dapat dikaitkan dengan terjadinya mutasi genetik pada bakteri (Marcusson *et al.*, 2005)<sup>18</sup>.

Tabel 2. Hasil penetapan nilai MIC uropatogen *E. coli* terhadap siprofloksasin setelah 2 jam perlakuan I menggunakan siprofloksasin dosis 750 mg

Kode*/K adar µg/mL	25	12	6	3	1	8	Kontr ol Nega tif
I	-	+	+	+	+	+	-
II	-	+	+	+	+	+	-
II	-	+	+	+	+	+	-

Keterangan \*Jumlah replikasi penetapan MIC

Tabel 3. Hasil penetapan nilai MIC uropatogen *E. coli* terhadap siprofloksasin setelah 2 jam perlakuan II menggunakan siprofloksasin dosis 750 mg dan 0,18 µg/mL  $\alpha$ -mangostin

Kode*/K adar µg/mL	25	12	6	3	1	8	Kontr ol Nega tif
I	-	+	+	+	+	+	-
II	-	+	+	+	+	+	-
II	-	+	+	+	+	+	-

Keterangan \*Jumlah replikasi penetapan MIC

Apabila melihat hasil penetapan nilai MIC setelah 2 jam perlakuan atau inkubasi, dapat disimpulkan bahwa kedua kelompok perlakuan tidak memberikan perbedaan pada kenaikan nilai MIC uropatogen *E. coli* (Tabel 2 dan 3). Nilai MIC bakteri pada kelompok perlakuan menggunakan siprofloksasin saja atau dengan kombinasi  $\alpha$ -mangostin tidak berbeda, yaitu 256 µg/mL. Jika dibandingkan dengan nilai MIC awal sebelum perlakuan, baik penggunaan siprofloksasin atau siprofloksasin kombinasi  $\alpha$ -mangostin tidak dapat mencegah terjadinya kenaikan MIC atau peningkatan resistensi. Uropatogen *E. coli* atau strain *E. coli* pada umumnya dapat bermutasi dan berkembang menjadi resisten dengan cepat, terutama apabila diberikan dosis obat yang subterapeutik (Van Der Horst *et al.*, 2011)<sup>19</sup>.

Resistensi dapat terjadi sesaat setelah dimulainya terapi menggunakan dosis subterapeutik. Peningkatan jumlah mutan resisten dapat terjadi secara bertahap selama berlangsungnya proses terapi (Smirnova *et al.*, 2009). Resistensi yang terjadi akibat penggunaan dosis terapeutik dapat dikategorikan sebagai *emergence resistant*<sup>3</sup>. Penelitian Fantin *et al.* (2009) mendeteksi strain *E. coli* resisten yang timbul pada hari ke 7, 14, dan 42 setelah perlakuan. Strain *E. coli* yang resisten tersebut adalah strain *E. coli* yang sebelum terapi merupakan strain

yang masih rentan terhadap siprofloksasin. Resistensi dilihat berdasarkan kenaikan nilai MIC yang diukur menggunakan metode dilusi agar<sup>20</sup>.

Resistensi bakteri terhadap antibiotika dapat berkembang cepat. Hal tersebut disebabkan adanya mekanisme *horizontal gene transfer* (HGT) dari strain resisten ke strain yang rentan. Kecepatan resistensi bakteri terhadap antibiotik ditentukan oleh kecepatan mutasi *de novo* dan HGT dari determinan pembawa resistensi. Mutasi yang paling sering terjadi adalah mengubah target aksi antibiotik dan meningkatkan efflux antibiotik. Mekanisme lainnya adalah amplifikasi gen, penurunan ekspresi target antibiotik, dan perubahan enzim untuk modifikasi obat (Andersson and Hughes, 2010). Nilai MIC lebih besar dari 32 µg/mL dapat terkait dengan mutasi pada *gyrA* dan *parC* atau kombinasi *marR*, *gyrA*, dan *parC*. Jika nilai MIC masih berada di bawah 1 µg/mL, mutasi terjadi pada gen *gyrA* atau *marR* saja (Anderson, 2010)<sup>21</sup>.

Sejauh ini, resistensi fluorokuinolon terhadap *E. coli* banyak dilaporkan. Mekanisme klasik resistensi pada fluorokuinolon terkait target aksi obat tersebut, yaitu pada DNA *gyrase* bakteri (*quinolone resistant determining region of the type II topoisomerase*). Resistensi tersebut terkait regulatori gen yang mempengaruhi permeabilitas fluorokuinolon masuk ke dalam sel bakteri (Allou *et al.*, 2009)<sup>10</sup>. Resistensi pada DNA *gyrase* bakteri dapat terjadi pada sub unit A atau B. Mutasi yang terletak pada gen *gyrA* merupakan penyebab tersering untuk menimbulkan terjadinya mutan *E. coli* resisten fluorokuinolon (Heisig dan Tschorny, 1994)<sup>22</sup>.

Lindgren *et al.* (2003) melakukan sekuensing DNA strain *E. coli* hasil isolat pasien ISK non komplikasi. Hasil sekuensing adalah terdapat mutasi terkait dengan gen *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *marOR*, dan *acrR*<sup>23</sup>. Gen *gyrA* dan *gyrB* adalah gen terkait DNA girase yang dibutuhkan untuk replikasi kromosom dan transkripsi. Pada perubahan

enzim target ini terjadi perubahan pengkodean alel asam amino terkait pada rantai DNA yang putus sewaktu enzim bekerja. Peningkatan awal nilai MIC biasanya terjadi melalui perubahan asam amino pada enzim target primer, kemudian derajat resistensi yang lebih tinggi dapat terjadi melalui langkah mutasi pada enzim target sekunder<sup>24, 25</sup>.

Sub unit *ParC* dan *ParE* yang dikode dari gen *parC* dan *parE* merupakan bagian topoisomerase IV yang penting untuk partisi kromosom. Penelitian di China, Amerika, dan Eropa membuktikan telah terdeteksi bentuk gen *qnr* pada *E. coli*. Gen *qnr* berfungsi melindungi DNA *gyrase* dan topoisomerase IV dari hambatan quinolon<sup>26</sup>. Gen *qnrA* merupakan mediator plasmid bakteri yang umum ditemukan, diikuti gen *qnrB19*, *qnrS1*, *aac(6')-ib*, dan *qepA* yang keseluruhannya dapat menyebabkan kenaikan nilai MIC fluoroquinolon 4 hingga 8 kali<sup>27</sup>.

Mutasi terhadap fluorokuinolon melalui jalur lain telah dilaporkan, yaitu mutasi yang menurunkan konsentrasi antibiotik di sitoplasma bakteri. Mutasi ini terjadi akibat peningkatan regulasi ekspresi pompa *efflux* pada transmembran endogen, yang disebabkan mutasi terkait gen *marOR* dan *acrR*<sup>23</sup>. Sistem *efflux* ini secara khusus memiliki tiga komponen, yaitu pompa *efflux* yang berlokasi di membrane sitoplasma, protein membrane luar, dan protein fusi membrane yang berlokasi antara keduanya. Adanya pompa *efflux* pada bakteri mampu mengakibatkan resistensi gabungan sehingga dikenal dengan istilah pompa multi drug resistance (MDR)<sup>28</sup>.

#### **Perlakuan pada uropatogen *E. coli*.**

Bakteri uropatogen *E. coli* strain resisten (MIC 128µg/mL) dibagi dalam tiga kelompok perlakuan, yaitu (I) memberi perlakuan pada sejumlah masing-masing strain uropatogen *E. coli* dengan siprofloksasin sesuai kadar rata-rata  $C_{max}$  pada dosis 750 mg yaitu 4,3 µg/mL, (II) memberi perlakuan pada sejumlah masing-

masing strain uropatogen *E. coli* dengan siprofloksasin sesuai kadar rata-rata  $C_{max}$  pada dosis 750 mg (4,3  $\mu\text{g/mL}$ ) dan  $\alpha$ -mangostin sesuai kadar maksimal subyek manusia setelah pemberian 60 mL jus manggis (0,18  $\mu\text{g/mL}$ ), serta (III) kelompok kontrol negatif.

Setelah 24 jam perlakuan, perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan metode perhitungan *indirect count* atau perhitungan tidak langsung, dengan cara mengukur absorbansi masing-masing perlakuan. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm. Pengukuran absorbansi juga dilakukan pada kontrol negatif yang terlihat jernih setelah 24 jam perlakuan. Kontrol negatif ada dua macam sesuai dengan perlakuan, yaitu (I) kontrol media dan siprofloksasin kadar 4,3  $\mu\text{g/mL}$ , (II) kontrol media, siprofloksasin kadar 4,3  $\mu\text{g/mL}$ , dan  $\alpha$ -mangostin kadar 0,18  $\mu\text{g/mL}$ . Kontrol negatif dibuat sesuai dengan dua macam perlakuan, untuk melihat pengaruh siprofloksasin dan  $\alpha$ -mangostin pada pembacaan absorbansi di panjang gelombang 625 nm. Berikut masing-masing pembacaan absorbansi pada kelompok kontrol negatif:

Tabel 4. Pembacaan absorbansi pada kontrol negatif masing-masing kelompok perlakuan, menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 625 nm.

Kelompok Kontrol Perlakuan	Absorbansi
I	0,060
II	0,064

Terlihat pada tabel 4, maka tidak terdapat perbedaan absorbansi pada semua kelompok kontrol negatif. Hal tersebut mengindikasikan bahwa adanya senyawa siprofloksasin atau dengan tambahan senyawa  $\alpha$ -mangostin tidak berpengaruh pada pembacaan di panjang gelombang 625 nm. Berikut pembacaan absorbansi pada masing-masing kelompok perlakuan:

Tabel 5. Pembacaan absorbansi pada sampel setelah 24 jam perlakuan pada masing-masing kelompok perlakuan I dan II, menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 625 nm

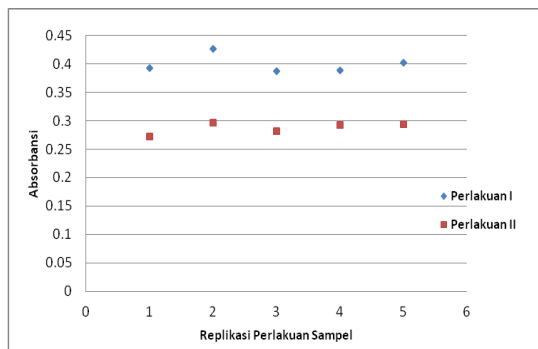
Replikasi	Perlakuan	
	1	2
I	0,393	0,272
II	0,427	0,296
III	0,387	0,281
IV	0,389	0,293
V	0,402	0,294

Terdapat perbedaan bermakna  $p < 0,000$  ( $p < 0,05$ ), menggunakan uji t statistika tidak berpasangan pada kedua kelompok perlakuan (Tabel 5). Penambahan  $\alpha$ -mangostin meningkatkan efek terapi dari siprofloksasin, dilihat dari nilai rata-rata absorbansi kelompok perlakuan II yang lebih kecil dibandingkan nilai absorbansi pada kelompok perlakuan I (Tabel 6 dan Gambar 2).

Tabel 6. Nilai rata-rata, standar deviasi, dan koefisien variasi pembacaan absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 625 nm, setelah 24 jam perlakuan pada masing-masing kelompok perlakuan I dan II

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata $\pm$ SD	Koefisien Variasi (%)
I	0,400 $\pm$ 0,016	4,09
II	0,287 $\pm$ 0,010	3,59

Siprofloksasin merupakan antibiotika golongan fluorokuinolon yang bekerja pada target aksi DNA *gyrase* bakteri. Fluorokuinolon mempunyai aktivitas antimikroba yang tergantung kadar, oleh karena itu, memaksimalkan kadar menjadi tujuan terapi pemberian fluorokuinolon. Parameter yang paling baik digunakan untuk menilai aktivitas fluorokuinolon adalah rasio  $C_{max}/MIC$  atau rasio  $AUC_{0-24}/MIC$  (Aminimanizani *et al.*, 2001)<sup>29</sup>.



Gambar 2. Absorbansi sampel setelah 24 jam inkubasi pada kelompok perlakuan I dan II, menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 625 nm.

Beberapa penelitian mengatakan bahwa secara umum rasio  $C_{max}/MIC$  harus mencapai angka di atas 8 dan rasio  $AUC_{0-24}/MIC$  harus melebihi 100 agar tercapai keberhasilan terapi infeksi bakteri Gram – bentuk. Angka tersebut juga diperlukan untuk mencegah kejadian *emergence resistance* saat yang terjadi selama proses terapi. Pellaquin *et al.* (1989) menyebutkan kejadian *emergence resistance* sebesar 80% pada terapi Gram – basil menggunakan siprofloksasin rasio  $C_{max}/MIC < 8$  atau rasio  $AUC_{0-24}/MIC < 100$ . Jika rasio  $C_{max}/MIC > 8$  atau rasio  $AUC_{0-24}/MIC \geq 100$ , kejadian *emergence resistance* dapat dicegah 8 kalinya, menjadi 10% dari keseluruhan terapi<sup>4</sup>.

Pada penelitian ini efek terapi tidak didapatkan karena rasio nilai  $C_{max}/MIC$  siprofloksasin adalah 4,3/128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  atau rasio tersebut  $< 1$ . Namun terlihat pada akhir inkubasi 24 jam, pemberian alfa mangostin memperlambat pertumbuhan bakteri uropatogen *E. coli*. Berbagai penelitian mengenai efek  $\alpha$ -mangostin pada pertumbuhan bakteri telah dilakukan. Bakteri Gram + dinyatakan lebih sensitif terhadap  $\alpha$ -mangostin dibandingkan bakteri Gram – (Koh *et al.*, 2013)<sup>11</sup>. Kombinasi ekstrak kulit manggis yang mengandung  $\alpha$ -mangostin dengan siprofloksasin dapat menghambat *E. coli* multiresisten jika dibandingkan dengan penggunaan tunggal siprofloksasin atau

ekstrak kulit manggis saja (Rahmawati, 2010)<sup>30</sup>.

Beberapa penelitian aktivitas alfa mangostin sebagai anti bakteri antara lain dikemukakan oleh Suksamrarn *et al.* (2003) dan Sudta *et al.* (2013) yang menyebutkan bahwa alfa mangostin poten menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Selain itu, alfa mangostin juga aktif terhadap *enterococci* dan *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin (MRSA)<sup>31,32</sup>. (Sakagami, 2005). Aktivitas bakterisida alfa mangostin terhadap MRSA secara *in vitro* dapat dengan cepat menurunkan koloni hingga  $10^3$  dalam waktu 5 menit<sup>33</sup>.

Alfa mangostin cepat merusak integritas membran sitoplasma bakteri sehingga komponen intrasel bakteri keluar dan bakteri mati (Koh *et al.*, 2013)<sup>11</sup>. Meskipun demikian, alfa mangostin dikatakan lebih efektif pada gram positif dibandingkan gram negatif. Nilai MIC pada *E. coli* hingga  $> 200 \text{ mg}/\text{L}$  (setara 82,09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Al Massarani *et al.*, 2013)<sup>34</sup>. *E. coli* dan *Klebsiella spp.* dikatakan hanya rentan moderat terhadap alfa mangostin jika dibandingkan *S. aureus* atau *P. aeruginosa* (Chaverri *et al.*, 2008)<sup>9</sup>.

## SIMPULAN

Pemberian kombinasi siprofloksain dan  $\alpha$ -mangostin dapat memperlambat pertumbuhan bakteri uropatogen *E. coli* pada strain resisten (nilai MIC 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dibandingkan dengan pemberian siprofloksasin saja. Namun kombinasi  $\alpha$ -mangostin dan siprofloksasin tidak dapat mencegah peningkatan resistensi strain uropatogen *E. coli*, yang ditandai dengan adanya peningkatan nilai MIC menjadi 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  setelah 2 jam perlakuan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas pemberian dana hibah penelitian dosen pemula.



## REFERENSI

1. Drussano, G.L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobial. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:589-95.
2. Mandal J, Acharya S, Buddhapriya D, Parija SC. Antibiotic resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant *Escherichia coli*. 2012
3. Smirnova, M. V., Vostrov, S.N., Strukova E.V., Dovzhenko, S.A., Kobrin, M.B., Portnoy, Y.A., Zinner, S.H., Firsov, A.A. The impact of duration of antibiotik exposure on bacterial resistance predictions using *in vitro* dynamic models. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:815-20.
4. Pelaquin, CA., Cumbo, TJ., Nix, DE., Sand, MF., and Schentag, JJ. Evaluation of intravenous ciprofloxacin in patients with nosocomial lower respiratory track infection. *Arch Intern Med* 1989; 149:2269-73
5. Gloede, J., Scheerans, C., Derendorf, H., and Kloft, C. *In vitro* pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:186-201.
6. Rakhmawatie MD, Mustofa. Efek perbedaan dosis siprofloksasin pada resistensi uropatogen *Escherichia coli*: simulasi model kinetika in vitro. 2012. Tersedia dalam etd.ugm.ac.id.
7. Craig, WA. Does the dose matter? *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (Suppl.3):S233-37.
8. Olofsson, S.K., Marcusson, L.L., Stromback, A., Hughes, D., and Cars, O. Dose related selection of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:795-801.
9. Chaverri JP, Rodriguez NC, Ibarra MO, and Rojas JMP. Review Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology* 2008; Vol. 46: 3227-39
10. Allou, N., Cambau, E., Massias, L., Chau, F., and Fantin, B. Impact of low-level resistance to fluoroquinolones due to qnrA1 and qnrS1 genes or a gyrA mutation on ciprofloxacin bactericidal activity in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(10):4292-97.
11. Koh JJ, Qiu S, Zou H, LakshminarayananR, Li J, Zhou X, et al. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; Vol 1828(2): 834-44
12. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2012. Diakses 11 Maret 2012 dari [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
13. Oxoid. Safety data sheet of eosin methylene blue agar (levine). 2010. Diakses 14 Maret 2015 dari [www.oxoid.com/pdf/msds/en/cm0069.pdf](http://www.oxoid.com/pdf/msds/en/cm0069.pdf)
14. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard ninth edition. CLSI 2012; M07-09 Vol. 32(2).
15. Chitchumroonchokchai C, Riedl KM, Suksumrarn S, Clinton SK, Kinghorn AD, and Faila ML. Xanthones in mangosteen juice are absorbed and partially conjugated by healthy adults. *Journal of Nutrition* 2012; Vol 142(4): 675-80
16. FDA. Ciprofloxacin. Ciprofloxacin Official FDA Information, Side Effects, and Uses. 2011. Diakses 15 September

- 2011 dari [www.drugs.com/pro/ciprofloxacin.html](http://www.drugs.com/pro/ciprofloxacin.html)
17. Lacy, MK., Klutman, NE., Horvart, RT., dan Zapantis A. Antibiograms: New NCCLS guidelines, development, and clinical application. *Hospital Pharmacy* 2004; Vol. 39(6): 542-53
  18. Marcusson, LL., Olofsson, SK., Lindgren, PK., Cars, O., and Hughes, D. Mutant prevention concentration of ciprofloxacin for urinary track infection isolates of *Escherichia coli*. *J, Antimicrob Chemother* 2005; Vol. 55: 939-43
  19. Van der Horst, MA., Schuurmans, JM., Smid, MC., Koenders, BB., and ter Kuile, BH. De novo acquisition of resistance to three antibiotic by *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist*, 2011; Vol. 17(2): 141-7
  20. Fantin, B., Duval, X., Massias, L., Alavoine, L., Chau, F., Retout, S., Andremont, A., and Mentre, F. Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human comensal bacteria. *J Infect Dis.* 2009; 200(3):390-8
  21. Andersson, DI., and Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:260-71. Diakses 10 Juli 2012 dari [www.nature.com/reviews/micro](http://www.nature.com/reviews/micro)
  22. Heisig, P. and Tschorny, R. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(6): 1284-91
  23. Lindgren, PK., Karlsson, A., Hughes, D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *E. coli* isolates from patients with urinary track infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10):3222-32.
  24. Pratiwi, Sylvia. *Mikrobiologi Farmasi: Pertumbuhan Mikroorganisme*. Jakarta: Erlangga. 2008
  25. Johnson James *et al.* Abrupt Emergence of a single dominant multidrug resistant strain of *E. coli*. *JID* 2013; 207
  26. Stephenson S, Brown PD, Holness A, WilksM. The emergence resistance of qnr-mediated quinolone resistance among enterobacteriaceae in Jamaica. *West Indian Med* 2010; J 59:241
  27. Mavriodi A, Miriagou V, Liakopoulous A, Tzelepi E, Stefos A, Dalekos GN, Petinaki A. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Central Greece: mechanism of resistance and molecular identification. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:371
  28. Giguere S, Prescott JF, Dowling PM. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Edisi ke-5. USA: Wiley Blackwell. 2013
  29. Aminimanizani, A., Beringer, P., and Jelliffe, R. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolon antibacterial. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40(3):169-87.
  30. Rahmawati, RD. Efek kombinasi antibiotik dan senyawa alfa mangostin dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*, L) terhadap *Escherichia coli* multiresisten antibiotik. 2010 Diakses 3 Juni 2015 dari <http://etd.eprints.ums.ac.id/id/eprint/10097>
  31. Suksamrarn S, Suwwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhilanlert J, Ratanukul P, Chimnoi N, et al. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003; Vol . 51(7): 857-59

32. Sudta P, Jiarawapu P, Suksamrarn A, Hongmanee P, Suksamrarn S. Potent activity against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis of  $\alpha$ -mangostin analogs. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2013; Vol. 61(2): 194-203
33. Sakagami, Y., Inuma, M., Piyasena, KG., Dharmaratne, HR. Antibacterial activity of alpha-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine* 2005; Vol. 12(3): 203-8
34. Al Massarani SM, El Gamal AA, Al Musayeib, NM, Mothana RA, Basudan OA, Al Rehaily AJ, et al. Phytochemical, antimicrobial, and antiprotozoal evaluation of *Garcinia mangostana* pericarp and  $\alpha$ -mangostin, its major xanthone derivative. *Molecules* 2013; Vol. 18: 10599-608.