

Daya Anti Bakteri Kombinasi Fosfomisin dan Sulbaktam-sefoperazon terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Agus Syahrurachman,* Fera Ibrahim,* Atna Permana**

*Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

**Rumah Sakit Haji Jakarta

Abstrak

Pendahuluan: *Pseudomonas aeruginosa* dapat merupakan penyebab infeksi diberbagai organ. Pilihan antibiotika tunggal untuk itu menjadi lebih sedikit.

Tujuan: Menilai daya antibakteri kombinasi fosfomisin dan sulbaktam-sefoperazon *in vitro* terhadap isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa*.

Metode: Uji kerentanan 30 isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* terhadap fosfomisin dan sefoperazone-sulbactam sebagai obat tunggal dan kombinasinya dilakukan pada media cair. Daya antibakteri kombinasi fosfomisin dan sulbactam sefoperazon ditentukan dengan menghitung Fraction Inhibition Index (FIC). Time-kill curve dinilai pasca paparan bakteri terhadap antibiotika selama waktu tertentu.

Hasil: Proporsi isolat yang sensitif sulbactam-sefoperazon sebanyak 66,7% dan meningkat menjadi 90% terhadap kombinasi antibiotika. Proporsi isolat yang sensitif fosfomisin hanya 10% dan meningkat dua kali lipat terhadap kombinasi antibiotika. Efek sinergis, indifferent dan antagonis masing-masing ditemukan pada 60%, 36.7% dan 3.3% isolat. Dari curva time kill disimpulkan bahwa kematian bakteri yang cepat terjadi dalam 4 jam pertama.

Kesimpulan: kombinasi sulbaktam sefoferazon dan fosfomisin pada sebagian besar isolat *Pseudomonas aeruginosa* bersifat sinergis dan hanya 1 galur yang menunjukkan efek antagonis.

Kata kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, fosfomisin, sulbaktam-sefoperazon, daya antibakteri *in vitro*.

Antibacterial Effect of Combination Fosfomycin and Sulbactam-Cefoperazone against *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria

Agus Syahrurachman,* Fera Ibrahim,* Atna Permana**

*Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

**Haji Hospital, Jakarta

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* may cause infections in various organs. Due to increase resistance, single antibiotic option for treatment of those infections is more limited.

Objective: to elucidate in vitro antibacterial effect of fosfomycin and sulbactam-cefoperazone alone and its combination against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Methods: Minimal Inhibitory concentration of fosfomycin and cefoperazone-sulbactam as a single drug and their combination was determined in liquid media against 30 clinical isolates of the *Pseudomonas aeruginosa*. Effect of antibiotic combination was calculated by Fraction Inhibitory Index. Time-kill curve was plotted according to the number of viable bacteria after antibiotic exposure.

Results: The proportion of susceptible isolate to sulbactam-cefoperazone alone was 66.7% and increased to 90 % to combined antibiotics. Proportion of susceptible bacteria to fosfomycin alone was 10 % and increase to 20 % to combined antibiotics. Synergistic, indifferent and antagonistic effects were found in 60%, 36.7% and 3.3% strains respectively. Rapid bacterial death occurred within the first 4 hours of exposure.

Conclusion : Combination of sulbactam-cefoperazone and fosfomycin have synergism in majority of tested strain of *Ps aeruginosa* and only one strain show antagonistic effect.

Keywords: In vitro antibacterial effects, *pseudomonas aeruginosa*, fosfomycin, sulbactam-cefoperazone.

Pendahuluan

Pseudomonas aeruginosa (*Ps aeruginosa*) dapat menimbulkan Infeksi di berbagai organ, baik terkait di rumah sakit maupun di komunitas. Pada orang sehat penyakit yang timbul biasanya ringan. Infeksi telinga dan kulit dapat terjadi setelah paparan dengan air yang tercemar. Sementara pada mata biasanya terjadi pada pemakaian lensa kontak. Pada fibrosis Cystic, *ps aeruginosa* merupakan penyebab infeksi terbanyak.¹

Akhir-akhir ini, masalah terkait *Ps aeruginosa* telah menjadi salah satu menjadi perhatian utama. *Ps.aeruginosa* menyebabkan infeksi berat, khususnya di rumah sakit dan penderita gangguan kekebalan tubuh. *Ps aeruginosa* sebagai penyebar resistensi terhadap antimikroba *in vivo*. Selain itu “multidrug resistant” (MDR) dan “Extensively drug resistant” (XDR) *Ps aeruginosa* yang termasuk kelompok “high

risk” karena telah berhasil menyebar di seluruh dunia.²⁻⁴ Meningkatnya bakteri yang multi resisten berakibat pada lebih sedikitnya pilihan antibiotika untuk terapi.⁵ Masalah menjadi lebih besar dengan makin banyaknya *Ps aeruginosa* yang resisten terhadap karpanem.⁶ Mengutip data CDC, MDR *Ps aeruginosa* merupakan penyumbang kematian pada 13% kasus infeksi terkait pada layanan kesehatan.⁷ Sebagai contoh, penelitian multicenter yang melibatkan 41 rumah sakit di Spanyol menunjukkan bahwa 26% isolat *Ps aeruginosa* adalah MDR dan 17% adalah XDR.⁸ Secara keseluruhan rentang prevalensi MDR *Ps aeruginosa* berkisar antara 15-30% tergantung geografi.⁸⁻¹⁰ Data nasional di Indonesia tentang hal ini belum ada, namun diperkirakan MDR dan XDR *Ps aeruginosa* lebih tinggi prevalensinya mengingat lebih longgarnya pengaturan pemakaian antibiotika di Indonesia.

Mempertimbangkan bahwa penemuan antibiotika baru sangat lambat, seperti yang

dinyatakan W.H.O,¹¹ penggunaan antibiotika kombinasi menjadi salah satu alternatif dalam mengatasi masalah ini. Sehubungan dengan hal tersebut, penelitian kombinasi antara fosfomisin dan sulperazon dilakukan.

Metode

Tempat dan Bakteri

Penelitian dilakukan di Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia menggunakan 30 galur bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps aeruginosa*) isolat klinis dari Bank kultur yang diambil secara acak. Bakteri diremajakan dahulu dalam kaldu Muller-Hinton pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum digunakan untuk tiap percobaan. Tiap percobaan dilakukan duplo. Suspensi bakteri selanjutnya distandarisasi pada pada kekeruhan 0,5 Mc Farland.

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) Tiap Antibiotika

Penentuan KHM dilakukan dengan cara dilusi makro dalam tabung berisi kaldu Muller-Hinton.¹² Ringkasnya pada 9 ml kaldu Muller-Hinton berisi sulbactam-sefoperazon (sulperazon) atau fosfomisin yang secara serial diencerkan 2 kali dicampur dengan 1

ml suspensi bakteri, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

KHM ditentukan dengan melihat tabung berisi antibiotika terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Penentuan KHM Antibiotika Kombinasi dan Indeks Fraction Inhibitory Concentration (FIC)

Penentuan KHM kombinasi juga dilakukan dengan cara Checkerboard titration.¹³ Ringkasnya dibuat panel tabung 8x8. Tiap tabung diisi 1 ml antibiotika tunggal atau kombinasinya dan selanjutnya ditambahkan inokulum bakteri 1 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C. Hasil dibaca setelah 24 jam. KHM kombinasi dinyatakan dengan KHM terendah dari kombinasi dua antibiotika tersebut yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. FIC dihitung dengan formula:¹⁴

$$\frac{\text{KHM obat A pada Kombinasi}}{\text{KHM obat A tunggal}} + \frac{\text{KHM obat B pada Kombinasi}}{\text{KHM obat B tunggal}}$$

Kombinasi dinyatakan bersifat sinergi jika FIC sama atau kurang dari 0.5; indifferent/ tak saling mempengaruhi jika FIC lebih dari 0.5

64 f	64f/2s	64f/4s	64f/8s	64f/16s	64f/32s	64f/64s	64 f/128s
32 f	32f/2s	32f/4s	32f/8s	32f/16s	32f/32s	32f/5/64s	32f/128s
16 f	16f/2s	16f/4s	Dst	Dst	Dst	Dst	Dst
8 f	8f/2s	8f/4s	Dst	Dst	Dst	Dst	Dst
4 f	4f/2s	4f/4s	Dst	Dst	Dst	Dst	Dst
2 f	2f/2s	2f/4s	dst	dst	dst	dst	dst
1 f	1f/2s	1f/4s	dst	dst	dst	dst	dst
0 f	2f	4f	8f	16f	32f	64f	128f

Gambar 1. Skema Teknik “Checkerboard” Titration

Catatan: absis menunjukkan konsentrasi fosfomisin, ordinat menunjukkan konsentrasi sulperazon. F=fosfomisin, s=sulperazon. Angka menunjukkan ug/ml.

sampai 1; dan antagonis/saling melemahkan jika FIC lebih dari 1.

Penilaian Daya Bunuh Antibiotika

Penilaian dilakukan terhadap 1 galur *Ps aeruginosa* yang menjadi peka terhadap kombinasi antibiotika. Penentuan daya bunuh antibiotika kombinasi mengacu pada metode baku.¹⁵ Pada tiap 10 ml kaldu *Muller-Hinton* yang mengandung KHM antibiotika sulperazon atau fosfomisin atau

kombinasinya atau tanpa antibiotika apapun, ditambahkan 0.1 ml suspensi bakteri yang telah distandarisasi seperti diatas dan diinkubasi pada suhu 37°C. Pada jam 0, 2, 4, 8 dan 24 diambil contoh uji untuk dihitung jumlah bakteri yang masih hidup dan tergambar pada jumlah koloni yang tumbuh. Jumlah koloni dihitung dengan menanamkan contoh uji pada pelat agar. Agar ditemukan plat agar yang menunjukkan jumlah koloni yang dapat percis dihitung, contoh uji

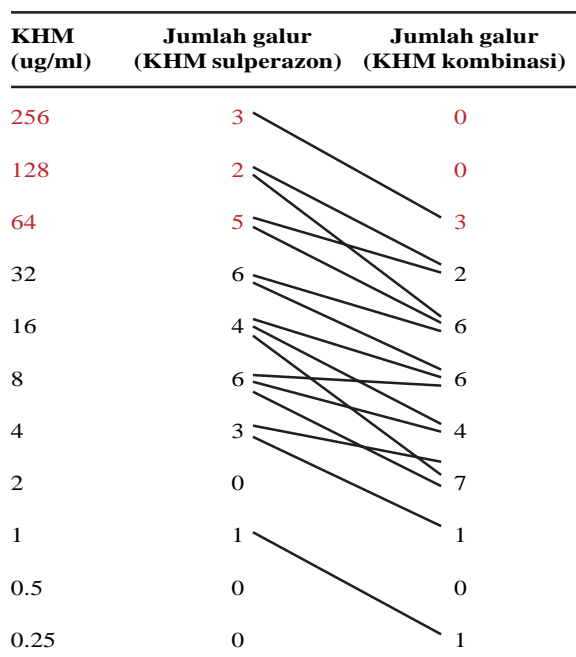
dencerkan serial 10 kali terlebih dahulu. Data yang didapat dibuat ilustrasinya.

Hasil

1. Efek kombinasi superazon dan fosfomisin terhadap *Ps aeruginosa*

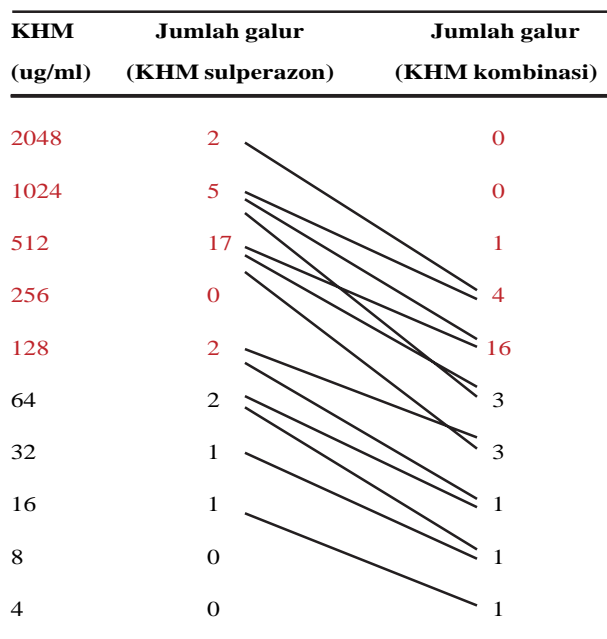
Rentang KHM sulperazon terhadap bakteri uji mulai dari 1 ug/ml sampai 256 ug/ml, sedangkan untuk kombinasi, mulai 0.25 ug/ml sampai 64ug/ml. Kombinasi secara nyata menurunkan KHM terhadap sulperazon. Jika bakteri dengan KHM 64 ug/ml dinyatakan sebagai bakteri resisten terhadap sulperazon, 10 galur *Ps aeruginosa* uji disebut bakteri resisten dan jumlahnya adalah 33,3%. Namun jika sulperazon dikombinasikan dengan fosfomisin, jumlah bakteri resisten turun menjadi 3 galur atau 10%.

Rentang KHM fosfomisin terhadap bakteri uji mulai dari 16 ug/ml sampai 2048 ug/ml, sedangkan untuk kombinasi, mulai 4 ug/ml sampai 512 ug/ml. Kombinasi secara nyata menurunkan KHM terhadap fosfomisin. Jika rerata hitung KHM dipakai sebagai pembanding, kombinasi fosfomisin dan sulperazon menurunkan KHM fosfomisin 75.8 % dengan simpang baku 19.2 % . Namun jika dinilai persentase bakteri sensitifnya, hanya 4 isolate yang sensitif terhadap fosfomisin saja dan 6 isolat yang sensitif terhadap antibiotika kombinasi.



Gambar 2. Efek Kombinasi Sulperazon dan Fosfomisin terhadap KHM Sulperazone pada 30 Galur *Ps. aeruginosa*

Catatan : bakteri resisten terhadap sulperazon jika KHM > 32 ug/ml.

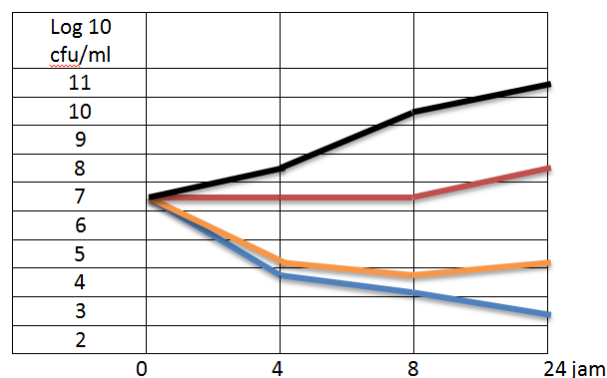


Gambar 3. Efek Kombinasi Sulperazon dan Fosfomisin terhadap KHM Fosfomisin pada 30 Galur *Ps. aeruginosa*

Catatan: Bakteri resisten terhadap fosfomisin jika KHM >64 ug/ml.

2. Penentuan efek kombinasi sulperazon dan fosfomisin

Rentang KHM antibiotika fosfomisin, sulperazon, sulperazon kombinasi dan fosfomisin kombinasi berturut-turut 16-2048 ug/ml, 1.0-256 ug/ml, 0.25-64 ug/ml dan 4.0-512 ug/ml. Rentang FIC galur *Ps aeruginosa* tersebar mulai dari 0.25 sampai 2 dengan rerata hitung 0.51. Hanya ditemukan 9 isolat yang mempunyai indek FIC maksimum 0.5 dan 1 isolat yang mempunyai indek FIC lebih dari 1.



Gambar 4. Kurva Daya Bunuh Antibiotika Tunggal dan Kombinasi Sulperazone-fosfomisin Terhadap Galur *Ps aeruginosa*

Keterangan : Garis hitam adalah pertumbuhan bakteri tanpa antibiotika, garis merah untuk satu galur bakteri *Ps aeruginosa* yang terpapar 128 ug/ml fosfomisin, garis kuning untuk bakteri terpapar 32 ug/ml sulperazon, dan garis biru untuk bakteri terpapar antibiotika kombinasi fosfomisin 64 ug/ml dan sulperazon 4 ug/ml.

3. Penilaian kinetika daya bunuh antibiotika

Penilaian kinetika daya bunuh antibiotika dilakukan pada 1 galur *Ps aeruginosa* yang diambil acak. Ternyata galur tersebut mempunyai KHM terhadap sulperazon dan fosfomisin masing-masing 32 (bakteri sensitif sulperazon) dan 512 (bakteri resisten fosfomisin) dengan indek FIC 0.25 (efek antibiotika kombinasi sinergis). Seperti terlihat pada gambar 4, Daya bunuh antibiotika kombinasi terutama tampak pada 4 jam pertama. Hal yang sama terhadap sulperazone. Fosfomisin tak mempunyai daya bunuh, hanya daya hambat dan itupun hanya dalam 8 jam pertama.

Diskusi

Penelitian *in vitro* untuk mendapatkan kandidat opsi pengobatan untuk infeksi oleh MDR atau XDR *Ps aeruginosa* telah banyak dilakukan. Penelitian seperti diatas banyak menarik perhatian karena kurang memuaskannya “*clinical outcome*” dan timbulnya seleksi bakteri resisten akibat terapi tunggal. Kemungkinan memperlebar spektrum, ditemukannya dampak sinergisme dan penghambatan timbulnya bakteri resisten merupakan faktor penting dalam terapi antibiotika kombinasi.¹⁶

Berbagai penelitian *in vitro* untuk menilai interaksi diantara antibiotik antipseudomoas telah dilakukan misalnya karbapenem, colistin dan polymyxin B, fosfomicin, aminoglicosida, danquinolone dengan berbagai cara seperti teknik “*checkerboard*”, difusi gradien dengan Etest, “*time-kill curve assays*”.^{17,18} Sinergisme kombinasi antibiotika terhadap MDR *Ps aeruginosa* misalnya dilaporkan untuk colistin-ceftazidime¹⁹, colistin-rifampisin,²⁰ cefepime-tobramycin,²¹ ceftazidime-avibactam-amikacin,²² imipenem-levofloxacin dan colistin-levofloxacin,²³ meropenem-ciprofloxacin,²⁴ fosfomycin-amikacin,²⁵ sulperazon-fosfomisin.¹⁴ Yang terahir dilakukan di Jepang oleh Hayshi. Efek sinergisme dari penelitian-penelitian tersebut diatas bervariasi.

Pada penelitian ini dipakai kombinasi sulperazon dan fosfomisin. 10 dari 30 galur *Ps aeruginosa* resisten terhadap sulperazon, 26 dari 30 galur resisten terhadap fosfomisin. Kombinasi sulperazon-fosfomisin konsisten menurunkan KHM, khususnya untuk fosfomisin. Hasil ini serupa dengan temuan Hayashi.¹⁴ Penilaian FIC pada penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum kombinasi sulperazon dan fosfomisin bersifat sinergis,yaitu pada 18 galur (60%), efek

antagonistik ditemukan pada 1 galur (3,3%) dan efek indiferent 11 galur (36.7%). Hasil ini agak berbeda dengan penelitian Hayashi dimana efek sinergisme ditemukan pada 47% isolat dan tidak ada yang antagonistik. Perbedaan ini secara pasti tidak diketahui penyebabnya, diperkirakan karena adanya perbedaan sifat galur bakteri yang digunakan.

Kesimpulan

KHM kombinasi sulbaktam sefoperazon dan fosfomisin untuk *Ps aeruginosa* turun dibandingkan KHM masing-masing obat. Efek antagonistik kombinasi hanya terjadi pada 3,3% dan karena itu diperkirakan pemakaian kombinasi obat diatas akan meningkatkan kesembuhan pasien terinfeksi *Ps aeruginosa*.

Daftar Pustaka

1. CDC. Pseudomonas aeruginosa in healthcare setting. 2013.
2. Poole K. Pseudomonas aeruginosa: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*. 2011 Apr 5;2:65.
3. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*. 2011 Aug 1;19(8):419-26.
4. Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C, Juan C. The increasing threat of Pseudomonas aeruginosa high-risk clones. *Drug Resistance Updates*. 2015 Jul 1;21:41-59.
5. Juan P, Horcajada, Milagro M, Antonio O, Luisa S, Sonia L, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin.Microb*. 2019;3:1-19.
6. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Mar 1;18(3):318-27.
7. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta. 2013.
8. del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Sánchez-Diener I, Cabot G,et al. Spanish nationwide survey on Pseudomonas aeruginosa antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019 Apr 15;74(7):1825-35.
9. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J,et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2014 Nov 6;60(4):539-48.
10. Walkty A, Lagace-Wiens P, Adam H, Baxter M, Karlowsky J, Mulvey MR, et al. Antimicrobial susceptibility of 2906 Pseudomonasaeruginosa clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008–2015. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2017 Jan 1;87(1):60-3.
11. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014.
12. Clinical Laboratory Standard Institue. Methods for dilution antimicrobial for susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 2015.
13. Hasegawa H. Combination chemotherapy of fosfomycin with other drugs. *The Jpn. J. Antibiot*. 1995;166:340-4.

14. Hayashi I, Sakurai M, Ichiki M, Sekine I, Nakayama K, Shiotani J, et al. Laboratory and clinical study on combined effects of fosfomycin plus sulbactam/cefoperazone for mixed infections of MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*. The Japanese journal of antibiotics. 1994 Jan;47(1):29-39.
15. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society of Microbiology; 1992.
16. Sader HS, Castanheira M, Duncan LR, Flamm RK. Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from United States medical centers stratified by infection type: results from the international network for optimal resistance monitoring (INFORM) surveillance program, 2015–2016. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2018 Sep 1;92(1):69-74.
17. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, Carmeli Y, Paul M. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013 Oct 1;57(10):5104-11.
18. Petrosillo N, Ioannidou E, Falagas ME. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. Clinical Microbiology and Infection. 2008 Sep 1;14(9):816-27.
19. Gunderson BW, Ibrahim KH, Hovde LB, Fromm TL, Reed MD, Rotschafer JC. Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003 Mar 1;47(3):905-9.
20. Timurkaynak F, Can F, Azap ÖK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SÖ. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. International journal of antimicrobial agents. 2006 Mar 1;27(3):224-8.
21. Drusano GL, Bonomo RA, Bahniuk N, Bulitta JB, VanScoy B, DeFiglio H, Fikes S, Brown D, Drawz SM, Kulawy R, Louie A. Resistance emergence mechanism and mechanism of resistance suppression by tobramycin for cefepime for *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012 Jan 1;56(1):231-42.
22. Abuhussain SS, Kuti JL, Nicolau DP. Antibacterial activity of human simulated epithelial lining fluid concentrations of ceftazidime-avibactam alone or in combination with Amikacin Inhale (BAY41-6551) against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2018 Jul 1;62(7):e00113-18.
23. Safarika A, Galani I, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis EJ. Time–kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: synergism with imipenem and colistin. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2015 Feb 1;34(2):317-23.
24. Rees VE, Yadav R, Rogers KE, Bulitta JB, Wirth V, Oliver A, et al. Meropenem combined with ciprofloxacin combats hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory infections of cystic fibrosis patients. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2018 Nov 1;62(11):e01150-18.
25. Sime FB, Johnson A, Whalley S, Santoyo-Castelazo A, Montgomery AB, Walters KA, et al. Pharmacodynamics of aerosolized fosfomycin and amikacin against resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in a hollow-fiber infection model: experimental basis for combination therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017 Jan 1;61(1):e01763-16.

