

## PENGARUH TEMBAGA (*CUPRUM*) TERHADAP TINGKAT RESISTENSI ANTIBIOTIK PADA *E. COLI* DI AIR LIMBAH RUMAH SAKIT TIPE C DI MALANG

Wahyu EL Pratama, Citra Destya Rahma Putri, Raden Muhammad Hardadi Airlangga\*  
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Tembaga banyak digunakan dalam sistem pipa rumah sakit dan terkandung dalam air limbah. Tembaga berpotensi mempengaruhi resistensi antibiotik pada *E. coli* melalui Multi Drug Efflux Pumps yang melibatkan mekanisme *cross-resistance*. Tujuan penelitian ini untuk mengevaluasi potensi resistensi antibiotik pada koloni *E. coli* yang resisten tembaga dari air limbah Pre-IPAL Rumah Sakit Tipe C di Malang.

**Metode:** Penelitian bersifat eksperimental in vitro, dengan pengambilan sampel air dari limbah Pre-IPAL. Kadar tembaga dianalisis menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS), dan dosis tembaga optimal ditentukan melalui metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Isolasi bakteri resisten tembaga dilakukan pada media *Chrom Agar* dan dianalisis dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Selanjutnya, bakteri resisten antibiotik diisolasi dari koloni bakteri resisten tembaga yang dikultur pada media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dan dianalisis menggunakan metode *Kirby-Bauer*.

**Hasil:** Kadar tembaga dalam air limbah Pre-IPAL adalah  $6,00 \pm 0,24$  mg/L, melebihi batas aman 2 mg/L. *E. coli* menunjukkan resistensi terhadap tembaga pada dosis 800 ppm, dengan rata-rata koloni pada media kontrol log  $4,30 \pm 0,22$  dan media perlakuan log  $2,47 \pm 0,29$ , menunjukkan perbedaan signifikan ( $p = 0,001$ ). Uji sensitivitas antibiotik mengungkapkan 80% *E. coli* sensitif terhadap Meropenem, 88% terhadap Ciprofloxacin, 72% terhadap Cotrimoxazole, dan 100% terhadap Gentamicin.

**Simpulan:** Penelitian ini menunjukkan bahwa *E. coli* yang resisten tembaga tidak selalu berpotensi membawa gen resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik dipengaruhi oleh persebaran gen resistensi di plasmid atau kromosom, kelarutan tembaga, mekanisme *cross-resistance*, serta faktor lingkungan seperti kadar tembaga dan durasi paparan.

**Kata Kunci:** Limbah air rumah sakit; *E. coli*; paparan tembaga; resisten antibiotik

\*Penulis Korespondensi:

dr. H. R. M. Hardadi Airlangga, Sp.PD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail: -

## THE EFFECT OF COPPER (*CUPRUM*) ON ANTIBIOTIC RESISTANCE LEVEL IN *E. COLI* IN TYPE C HOSPITAL WASTEWATER IN MALANG

Wahyu EL Pratama, Citra Destya Rahma Putri, Raden Muhammad Hardadi Airlangga\*  
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

### ABSTRACT

**Introduction:** Copper is widely used in hospital pipe systems and is contained in wastewater. Copper has the potential to affect antibiotic resistance in *E. coli* through *Multi Drug Efflux Pumps* involving *cross-resistance* mechanisms. The aim of this study was to disseminate the potential for antibiotic resistance in copper-resistant *E. coli* colonies from Pre-IPAL wastewater of Type C Hospital in Malang.

**Methods:** The study was an in vitro experimental study, with water sampling from pre-IPAL waste. Copper levels were analyzed using an *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS), and the optimal copper dose was determined using the *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) method. Isolation of copper-resistant bacteria was carried out on *Chrom Agar* media and analyzed using the *Total Plate Count* (TPC) method. Furthermore, antibiotic-resistant bacteria were isolated from copper-resistant bacterial colonies cultured on *Mueller-Hinton Agar* (MHA) media and analyzed using the *Kirby-Bauer* method.

**Results:** Copper levels in Pre-IPAL wastewater were  $6,00 \pm 0,24$  mg/L, exceeding the safe limit of 2 mg/L. *E. coli* showed resistance to copper at a dose of 800 ppm, with an average colony in the control media log  $4,30 \pm 0,22$  and treatment media log  $2,47 \pm 0,29$ , showing a significant difference ( $p=0.001$ ). Antibiotic sensitivity tests revealed that 80% of *E. coli* were sensitive to Meropenem, 88% to Ciprofloxacin, 72% to Cotrimoxazole, and 100% to Gentamicin.

**Conclusion:** This study shows that copper-resistant *E. coli* does not always have the potential to carry antibiotic resistance genes. Antibiotic resistance is influenced by the distribution of resistance genes in plasmids or chromosomes, copper solubility, *cross-resistance* mechanisms, and environmental factors such as copper levels and duration of exposure.

**Keywords:** Hospital wastewater; *E. coli*; copper exposure; antibiotic resistance

\*Corresponding Author:

dr. H. R. M. Hardadi Airlangga, Sp.PD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

e-mail: -

## PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial merupakan masalah kesehatan yang signifikan, sering kali disebabkan oleh bakteri seperti *E.coli*. Infeksi nosokomial, yang terjadi di rumah sakit, dapat meningkatkan morbiditas, mortalitas, dan biaya perawatan kesehatan. Data menunjukkan bahwa *E.coli* menyumbang sekitar 18% dari infeksi nosokomial di seluruh dunia (1). Sebagai patogen oportunistik, *E.coli* dapat menyebabkan berbagai infeksi di rumah sakit, termasuk Infeksi Saluran Kemih (ISK), bakteremia, pneumonia, infeksi luka operasi, infeksi saluran pencernaan, dan sepsis (2).

Masalah yang semakin mendesak adalah resistensi antibiotik yang dialami oleh *E.coli*, yang berpotensi mengurangi efektivitas *gold standar* terapi. *World Health Organization* pada tahun 2017 mengidentifikasi bakteri resisten obat, termasuk golongan *Enterobacteriaceae* seperti *E.coli*, sebagai ancaman serius di lingkungan rumah sakit (3). Resistensi antibiotik pada *E.coli* dipengaruhi oleh faktor intrinsik, seperti plasmid yang membawa gen resistensi, dan faktor ekstrinsik, termasuk penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan paparan lingkungan, terutama logam berat (4).

Tembaga adalah salah satu logam berat yang sering ditemukan di lingkungan rumah sakit, terutama dalam sistem pipa air dan limbah (5). Paparan tembaga dapat mempengaruhi *E.coli* untuk mengembangkan resistensi terhadap tembaga dengan bantuan regulator CueR yang mengatur gen-gen seperti CueO dan CopA. Gen-gen ini membantu bakteri mengatasi tembaga dengan mengoksidasi dan mengeluarkannya dari sel. Paparan tembaga yang tinggi dapat menyebabkan bakteri membentuk *Metal Resistance Genes* (MRG) dan juga meningkatkan kemungkinan terbentuknya *Antibiotic Resistance Genes* (ARG) melalui mekanisme *cross-resistance* (6).

Sehubungan dengan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi jumlah koloni *E.coli* yang berpotensi mengembangkan resistensi antibiotik pada koloni yang resistensi tembaga dari air limbah di Rumah Sakit Tipe C di Malang. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan wawasan tentang pola resistensi bakteri ini dan merumuskan pedoman untuk penggunaan antibiotik yang lebih rasional.

## METODE PENELITIAN

### Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental secara *in vitro*, untuk mengetahui potensi resistensi antibiotik Cotrimoxazole, Gentamicin, Ciprofloxacin, dan Meropenem pada bakteri *E.coli* terhadap paparan logam berat tembaga dari air limbah Rumah sakit tipe C di Malang. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juni hingga Juli 2024 di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (LPRK FK UNISMA).

### Sampel dan Populasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah air limbah sebelum memasuki IPAL Rumah sakit tipe C di Malang. Dan penelitian ini menggunakan polulasi koloni bakteri *E.coli* yang didapatkan dari air limbah sebelum memasuki IPAL

### Kultur Bakteri *E.coli*

Kultur bakteri *E.coli* dilakukan menggunakan media *ChromAgar* CCA. Sampel air didilusi dengan kekuatan  $10^0$ ,  $10^{-1}$ , dan  $10^{-2}$ . Sampel yang telah didilusi, kemudian diambil sebanyak 100  $\mu$ L dan dilakukan kultur pada media *ChromAgar* CCA tanpa Tembaga (*Cuprum*) sebagai media kontrol dan *ChromAgar* CCA yang tersuspensi Tembaga (*Cuprum*) 800 ppm sebagai media perlakuan. Kemudian bakteri yang telah dikultur, disimpan dalam inkubator selama 24 jam (7). Setelah 24 jam, hitung koloni pada media kontrol dan media perlakuan, serta dilakukan determinasi pada masing-masing cawan petri. Setiap cawan petri dinyatakan dapat diterima atau dapat dilakukan perlakuan jika total koloni sebesar 30 hingga 300 koloni (8).

### Perhitungan Jumlah Sampel Penelitian

Total koloni yang didapat kemudian dihitung dengan rumus berikut untuk memperkirakan jumlah koloni bakteri per mililiter air.

$$n \text{ (CFU/ml)} = \frac{\sum \text{koloni}}{\text{Kekuatan pengenceran (L)} \times \text{Volume yang digunakan untuk kultur}}$$

Koloni yang didapatkan dari media kontrol dan perlakuan kemudian dilakukan perhitungan menggunakan *Slovin Formula* sebelum dilakukan sub-kultur pada media selanjutnya (9). Pada perhitungan ini didapatkan hasil sebesar

$$n = \frac{N}{1 + (N \times e^2)}$$

$$n = \frac{104}{1 + (104 \times (17,5\%)^2)}$$

$$n = \frac{104}{1 + (104 \times 0,0306)}$$

$$n = \frac{104}{4,185}$$

$$n = 24,85$$

### Uji Determinasi *E.coli* dengan Media MacConkey

*MacConkey* merupakan media *differential selective* yang kegunaannya untuk mengidentifikasi bakteri gram negatif berdasarkan kemampuan memfermentasikan laktosa. Determinasi bakteri *E.coli* pada media *MacConkey* dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama, jarum ose dipanaskan untuk sterilisasi. Kemudian diambil koloni bakteri dari media Chrom Agar CCA yang tersuplementasi Tembaga 800 ppm menggunakan jarum ose yang sudah steril. Koloni yang diambil distreaking pada media *MacConkey* dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (10). Koloni yang tumbuh dianalisa berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi laktosa, koloni yang tidak mampu memfermentasikan laktosa akan berwarna kuning pucat, sedangkan bakteri yang mampu memfermentasikan laktosa akan berwarna merah. Koloni bakteri *E.coli* akan membentuk koloni berwarna merah karena mampu memfermentasi laktosa (11).

### Uji Determinasi *E.coli* dengan Pewarnaan Gram

Untuk mengkonfirmasi ulang, dilakukan pengecatan Gram pada koloni bakteri. Langkah awalnya, panaskan ose dan *object glass* di atas bunsen, lalu ambil koloni bakteri dalam media *MacConkey* menggunakan ose steril. Setelah itu, oleskan pada *object glass* steril, kemudian ditetaskan akuades steril, dan ratakan. Tunggu hingga mengering dengan sendirinya dalam suhu ruangan. Selanjutnya, teteskan Kristal Violet atau Gentian Violet, diamkan selama 30 detik, dan bilas dengan air mengalir. Teteskan lugol, diamkan selama 30 detik, dan bilas dengan air mengalir. Teteskan alkohol 96% hingga tidak ada lagi larutan ungu yang luntur. Teteskan safranin, diamkan selama 30 detik, dan bilas dengan air mengalir. Keringkan dengan menggunakan tisu tanpa mengusap bagian atas gelas objek. Beri minyak immersi dan lihat dibawah mikroskop pembesaran 1000x. Koloni bakteri Gram positif akan berwarna keunguan, sementara koloni

bakteri Gram negatif akan berwarna kemerahan. *E.coli* merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk basil, sehingga pada pengamatan akan didapatkan bakteri berbentuk batang berwarna merah (12).

### Uji Sensitivitas Antibiotik *E.coli*

Koloni yang tumbuh pada media *MacConkey* diambil senyak 2-5 koloni untuk dilarutkan dalam saline steril dan membentuk inokulum. Inokulum yang terbentuk kemudian distandarisasi menggunakan *Mc Farland Standard* 0,5 sebelum dilakukan sub-kultur koloni pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA)(13). Setelah inokulum siap, dilakukan sub-kultur koloni pada media MHA dan diletakkan cakram antibiotik dan cakram Tembaga (*Cuprum*) sebagai kontrol yang berbeda pada masing-masing media(14). Antibiotik yang digunakan Cotrimoxazole (250-300 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Gentamicin (10 µg), Meropenem (10 µg). Peletakan cakram antibiotik dilakukan dengan memberi jarak sebesar 30-40 mm. Diameter *Zone of Inhibition* (ZOI) di sekitar diskus antibiotik diukur menggunakan mistar dan dievaluasi berdasarkan ketentuan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (15).

**Tabel 1. Nilai Standar Resistensi Antibiotik**

| Jenis Antibiotik         | Zone Diameter Breakpoints (nearest mm) |         |      |
|--------------------------|----------------------------------------|---------|------|
|                          | S                                      | I       | R    |
| Cotrimoxazole 250-300 µg | ≥ 17                                   | 13 – 16 | ≤ 12 |
| Gentamicin 10 µg         | ≥ 15                                   | 13 – 14 | ≤ 12 |
| Ciprofloxacin 5 µg       | ≥ 26                                   | 22 – 25 | ≤ 21 |
| Meropenem 10 µg          | ≥ 23                                   | 20 – 22 | ≤ 19 |

### Metode Analisa Data

Analisa data dilakukan menggunakan IBM SPSS software for windows. Data hasil penelitian akan diuji normalitas dan homogenitas. Pada data yang dinyatakan memenuhi standar homogenitas dan normalitas (Nilai  $P > 0,05$ ) menggunakan uji analisa statistik *One Way Analysis of Varians* (ANOVA). Jika data dinyatakan tidak memenuhi standar homogenitas dan normalitas maka menggunakan uji analisa statistik t-test. Uji dilakukan dengan membandingkan jumlah bakteri dengan paparan Tembaga (*Cuprum*) dan tanpa paparan Tembaga (*Cuprum*), serta membandingkan jumlah bakteri dan tingkat resistensinya (Sensitif, Intermediet, dan

Resisten) pada seluruh ulangan sampel selama 3 hari yang berbeda.

## HASIL DAN ANALISA DATA

### Hasil Kadar Tembaga (*Cuprum*) dari Air Limbah di Rumah sakit tipe C di Malang

Hasil pengukuran kadar Tembaga (*Cuprum*) dari air limbah pre-IPAL Rumah sakit tipe C di Malang dengan menggunakan uji AAS ditunjukkan pada Tabel.

**Tabel 2. Hasil Uji AAS**

| Sampel              | Parameter | Pereaksi         | Hasil Analisis |
|---------------------|-----------|------------------|----------------|
| Air Limbah Pre-IPAL | Cu        | HNO <sub>3</sub> | 6,00 mg/L      |

Keterangan: Baku mutu air limbah Rumah Sakit Berdasarkan Menteri Lingkungan Hidup Indonesia No. 5 tahun 2014 yaitu 2 mg/L.

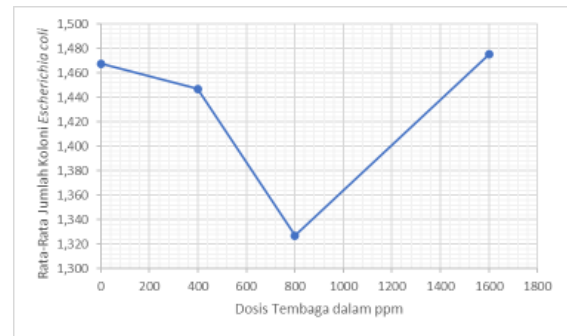
Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar Tembaga (*Cuprum*) pada Pre-IPAL Rumah sakit tipe C di Malang lebih tinggi dari baku mutu air limbah rumah sakit yang ditetapkan oleh peraturan Menteri lingkungan hidup Indonesia Nomor 5 Tahun 2014 yaitu sebesar 2 mg/L. Hal ini menjadi peringatan agar ketika air limbah masuk ke IPAL mendapatkan perlakuan *eliminasi* logam berat tembaga lebih baik, sehingga ketika air limbah keluar dari IPAL tidak melebihi baku mutu yang ditetapkan oleh peraturan Menteri lingkungan hidup Indonesia Nomor 5 Tahun 2014.

### Penentuan Dosis Tembaga (*Cuprum*)

Hasil optimasi dosis tembaga akan digunakan sebagai parameter optimum untuk penelitian. Penentuan dosis tembaga optimum dapat ditentukan dari konsentrasi tembaga dalam ppm yang dapat membunuh bakteri hingga sekitar  $\pm 50\%$  dari jumlah koloni awal. Pada uji penentuan dosis tembaga, menggunakan sampel *E.coli* dari penelitian air limbah rumah sakit sebelumnya yang sudah diremajakan. Menurut penelitian sebelumnya bahwa konsentrasi KHM yang digunakan untuk uji terhadap *E.coli* berkisar pada dosis 100-2000 ppm (17). Hasil uji KHM dapat dilihat pada Tabel 3. dan Gambar 1.

**Tabel 3. Hasil Uji KHM**

| Sampel <i>E.coli</i>       | Dosis Tembaga ( <i>Cuprum</i> ) dalam ppm |       |       |       |
|----------------------------|-------------------------------------------|-------|-------|-------|
|                            | 0                                         | 400   | 800   | 1600  |
| Rata-rata nilai absorbansi | 1,467                                     | 1,447 | 1,327 | 1,475 |

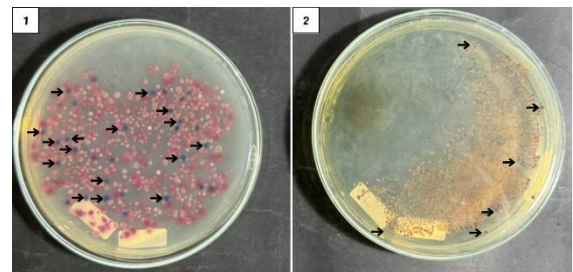


**Gambar 1. Mean Plot Hasil Uji KHM**

Setelah dilakukan metode uji optimasi dengan KHM konsentrasi tembaga optimum yang resisten terhadap bakteri *E.coli* adalah 800 ppm.

### Hasil Penghitungan Koloni Bakteri *E.coli* yang Resisten Terhadap Tembaga (*Cuprum*) dari Air Limbah Di Rumah sakit tipe C di Malang

Hasil kultur bakteri *E.coli* pada media ChromAgar dapat dilihat pada Gambar 2. yang berwarna biru-keunguan.



**Gambar 2. (1) Hasil Kultur Koloni Bakteri *Escherichia coli* pada media ChromAgar CCA yang tidak tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) dan (2) media ChromAgar CCA yang tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*)**

Keterangan: (1) hasil kultur koloni bakteri pada media ChromAgar tanpa tembaga dan (2) hasil kultur koloni bakteri dengan tembaga 800 ppm.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jumlah bakteri *E.coli* pada media ChromAgar CCA yang tidak tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) lebih banyak daripada media ChromAgar CCA yang tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Hasil Perhitungan *Eschericia coli* yang tumbuh pada media *ChromAgar* CCA yang tidak tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) dan media *ChromAgar* CCA yang tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*)**

| Sampel                              | TPC <i>E.coli</i><br>(Log CFU/ml) |           |           | Mean<br>(Log <sub>10</sub> )<br>± SD | Signifikansi |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|--------------------------------------|--------------|
|                                     | Hari Ke-1                         | Hari Ke-2 | Hari Ke-3 |                                      |              |
| <i>Chrom Agar</i>                   | 4.39                              | 4.04      | 4.46      | 4,30 ± 0,22                          |              |
| <i>Chrom Agar + Tembaga 800 ppm</i> | 2.17                              | 2.75      | 2.50      | 2,47 ± 0,29                          | 0,001        |

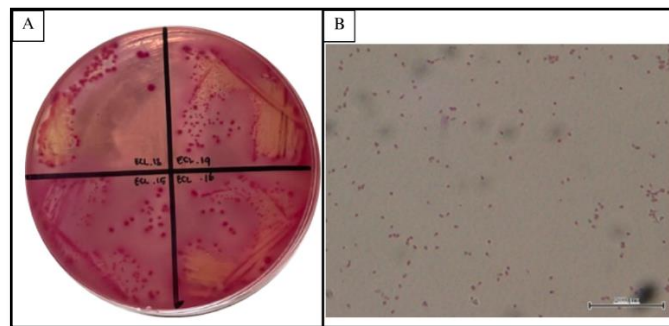
Hasil perhitungan *Total Plate Count* (TPC) pada bakteri *E.coli* pada media *ChromAgar* CCA yang tidak tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) diubah menjadi CFU/ml untuk memperkirakan jumlah koloni yang terdapat dalam limbah air. Kemudian data tersebut diubah dalam bentuk Log<sub>10</sub> untuk menganalisis perbedaan jumlah koloni bakteri dalam limbah dengan lebih detail. Selanjutnya,

data yang didapatkan di uji *independent t-test*, hasil menunjukkan ada perbedaan secara signifikan  $p < 0,05$ .

#### Uji Determinasi Bakteri *E.coli* yang Didapat dari Air Limbah Di Rumah sakit tipe C di Malang

Koloni bakteri *E.coli* yang didapatkan pada media *ChromAgar* CCA yang tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) 800 ppm akan diinokulasikan pada saline steril kemudian dikultur pada media *MacConkey*. Hasil yang didapatkan pada media *MacConkey*, *E.coli* akan terlihat berwarna pink/merah (**Gambar 4A.**) karena *E.coli* merupakan bakteri yang bersifat lactose fermenting positif.

Kemudian dilakukan uji determinasi dengan pewarnaan Gram untuk konfirmasi ulang bakteri yang didapat dari koloni yang dikultur pada media kultur merupakan bakteri *E.coli*. Hasil yang didapat setelah dilakukan pengecatan Gram, pada bakteri *E.coli* akan berbentuk basil atau batang dan berwarna merah yang dapat dilihat pada (8) **Gambar 4B.**

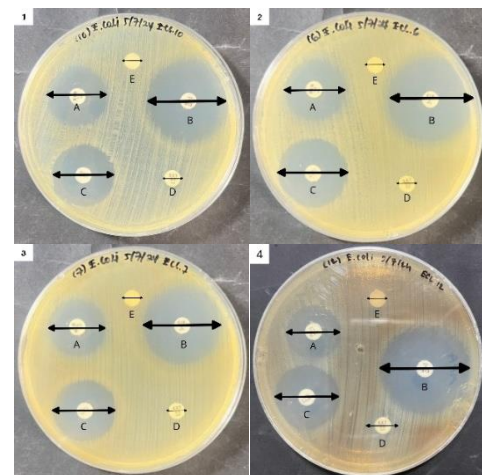


**Gambar 3. (A) Hasil Determinasi Bakteri *Eschericia coli* pada media *MacConkey* dan (B) Hasil Determinasi Bakteri *Eschericia coli* pada Pewarnaan Gram perbesaran 1000x**

Keterangan: Bakteri *Eschericia coli* berwarna pink pada media *MacConkey*. Bakteri *Eschericia coli* berbentuk basil atau batang dan berwarna merah (Gram negatif) pada pewarnaan Gram

#### Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik Meropenem, Ciprofloxacin, Gentamicin dan Ceftazidime pada Bakteri *E.coli*

Uji sensitivitas bakteri *E.coli* terhadap antibiotik meropenem, ciprofloxacin, gentamicin dan cotrimoxazole dilakukan dengan metode *disc diffusion* pada media MHA. Kemudian dilakukan pengukuran diameter *Zone of Inhibition* (ZOI) di sekitar lempengan diskus antibiotik menggunakan jangka sorong dan di evaluasi hasil pengukuran ZOI sesuai ketentuan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Hasil uji ditunjukkan pada **Tabel 6.** dan gambaran hasil ZOI *Escherichia coli* pada antibiotik Meropenem, Ciprofloxacin, Gentamicin dan Cotrimoxazole ditunjukkan pada **Gambar 5.**



**Gambar 4. Hasil ZOI *E.coli* pada antibiotik Meropenem, Ciprofloxacin, Gentamicin dan Cotrimoxazole**

Keterangan: Gambar (1) A Meropenem Intermediate ; B Ciprofloxacin Sensitive; C Gentamicin Sensitive; D Ceftazidime Resistant; E Kontrol Tembaga (*Cuprum*) Resistant. Gambar (2) A Meropenem Sensitive ; B Ciprofloxacin Resistant; C Gentamicin Sensitive; D Ceftazidime Resistant; E Kontrol Tembaga (*Cuprum*) Resistant. Gambar (3) A Meropenem

Intermediate ; B Ciprofloxacin Intermediate; C Gentamicin Sensitive; D Ceftazidime Resistant; E Kontrol Tembaga (*Cuprum*) Resistant. Gambar (4) A Meropenem Intermediate ; B Ciprofloxacin Sensitive; C Gentamicin Sensitive; D Ceftazidime Resistant; E Kontrol Tembaga (*Cuprum*) Resistant

**Tabel 5. Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik**

| Antibiotik    | Sampel Pre-IPAL               |                                         |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------------------|
|               | Jumlah Sampel (n = 25 koloni) | Rerata Luas Zona Inhibisi (mm) $\pm$ SD |
| Meropenem     | S                             | 20 (80%)                                |
|               | I                             | 4 (16%)                                 |
|               | R                             | 1 (4%)                                  |
| Ciprofloxacin | S                             | 22 (88%)                                |
|               | I                             | 2 (8%)                                  |
|               | R                             | 1 (4%)                                  |
| Gentamicin    | S                             | 25 (100%)                               |
|               | I                             | 0 (0%)                                  |
|               | R                             | 0(0%)                                   |
| Cotrimoxazole | S                             | 18 (72%)                                |
|               | I                             | 0 (0%)                                  |
|               | R                             | 7 (28%)                                 |

Keterangan: S: *Susceptible*, I: *Intermediate*, R: *Resistant*

## PEMBAHASAN

### Kadar Tembaga (*Cuprum*) dari Air Limbah di Rumah sakit tipe C di Malang

Pengukuran kadar tembaga (*Cuprum*) dalam air limbah dari Pre-IPAL Rumah sakit tipe C di Malang menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) menunjukkan hasil yang signifikan, yaitu  $6,00 \pm 0,24$  mg/L. Nilai ini jauh melebihi Baku Mutu Air Limbah yang ditetapkan oleh Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2014, yaitu sebesar 2 mg/L. Hal ini menjadi peringatan agar ketika air limbah masuk ke IPAL mendapatkan perlakuan *eliminasi* logam berat tembaga lebih baik, sehingga ketika air limbah keluar dari IPAL tidak melebihi baku mutu yang ditetapkan oleh peraturan Menteri lingkungan hidup Indonesia Nomor 5 Tahun 2014 (18).

Kandungan logam berat yang terkandung di air limbah rumah sakit dihasilkan oleh aktivitas laboratorium rumah sakit (19). Air limbah di rumah sakit sering mengandung logam berat, termasuk tembaga, yang berasal dari bahan-bahan yang digunakan dalam sistem pipa-pipa pengalir air (5)(20). Korosi pada pipa

tembaga dapat menyebabkan pelepasan tembaga ke dalam air, sehingga meningkatkan kadar logam berat dalam limbah (21). Ion tembaga ( $\text{Cu}^{1+}$ ), yang dapat terlarut dalam air, berpotensi memberikan dampak negatif pada mikroba di dalam air, termasuk bakteri (5).

### Penentuan Dosis Tembaga (*Cuprum*)

Penentuan dosis dilakukan dengan uji KHM untuk mengetahui dosis tembaga terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri (22). Menurut penelitian sebelumnya bahwa konsentrasi KHM yang digunakan untuk uji terhadap *E.coli* berkisar pada dosis 100-2000 ppm (17). Hasil KHM menunjukkan adanya penurunan nilai absorbansi dari konsentrasi 0 ppm hingga 800 ppm. Setelah 800 ppm, nilai absorbansi meningkat. Faktor yang menyebabkan nilai absorbansi setelah 800 ppm meningkat yaitu kelarutan serbuk tembaga dalam air dan media. Serbuk tembaga dalam air dan media tidak bisa larut sempurna jika konsentrasinya terlalu tinggi. Sehingga ketika kadar tembaga dalam air melebihi 800 ppm, ada sebagian serbuk tembaga yang tidak terlarut dan terhitung dalam nilai absorbansi, sehingga nilai absorbansinya meningkat. Oleh karena itu dari metode uji

optimasi dengan KHM, didapatkan bahwa dosis tembaga optimum dalam menciptakan kondisi lingkungan yang berdampak pada bakteri *E.coli* menjadi resisten adalah 800 ppm.

#### **Jumlah Koloni Bakteri *E.coli* yang Resistan Terhadap Tembaga (*Cuprum*) dari Air Limbah Di Rumah sakit tipe C di Malang**

Hasil dari perhitungan jumlah koloni *E.coli* di saluran pembuangan air pada media *ChromAgar* CCA yang tidak tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) dan *ChromAgar* CCA yang tersuplementasi Tembaga (*Cuprum*) terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Didapatkan perbedaan dari media kontrol dan perlakuan berkisar log 1,82 (CFU/mL), yang mengimplimentasikan jumlah bakteri *E.coli* yang toleran dan tereliminasi akibat adanya paparan tembaga. Hal ini selaras dengan penelitian sebelumnya, bahwa paparan tembaga dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *E.coli* (23).

Dari hasil penelitian ini, sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa bakteri *E.coli* yang resisten tembaga dapat terjadi akibat mekanisme pertahanan bakteri terhadap paparan tembaga (*cuprum*) yang diaktifkan oleh regulator transkripsi yang disebut CueR. CueR bertanggung jawab untuk mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam resistensi terhadap ion tembaga, seperti CueO dan CopA. CueO berperan dalam mengoksidasi ion tembaga ( $\text{Cu}^{1+}$ ) menjadi bentuk yang lebih mudah diekskresikan, yaitu  $\text{Cu}^{2+}$ , sedangkan CopA berperan dalam memompa ion tembaga ( $\text{Cu}^{1+}$ ) keluar dari sitoplasma. Sistem adaptasi ini bertujuan untuk mengatasi toksisitas ion tembaga dengan cara mengoksidasi dan mengeluarkannya dari sel bakteri. Ketika kadar tembaga yang terpapar tinggi, maka bakteri akan mengalami over expression homeostasis. Hal ini terjadi karena gen-gen CueR, CueO, dan CopA menjadi lebih aktif dan menghasilkan lebih banyak protein. Akibatnya, terbentuklah *Metal Resistance Genes* (MRG) yang dapat membuat bakteri menjadi lebih resisten terhadap Tembaga (*Cuprum*) (6) Berdasarkan perbedaan yang didapatkan dari media kontrol dan perlakuan menunjukkan bahwa pada saluran pembuangan air rumah sakit terdapat koloni *E.coli* yang berpotensi resisten terhadap tembaga.

Faktor yang mempengaruhi adanya bakteri yang toleran dan resisten dapat berupa kelarutan Tembaga (*Cuprum*) dalam media uji. Selain itu, faktor lain seperti lamanya waktu

pemaparan tembaga dan kondisi lingkungan juga turut mempengaruhi. Jika waktu paparan yang singkat antara tembaga dan bakteri berarti bakteri tidak memiliki cukup waktu untuk mengembangkan atau mempertahankan resistensi, karena resistensi tidak akan berkembang tanpa paparan yang konsisten dan cukup lama. Kondisi lingkungan dalam saluran pembuangan seperti dominasi senyawa kimia lain atau logam berat juga dapat memengaruhi gen resistensi (24).

#### **Uji Sensitivitas Antibiotik Meropenem, Ciprofloxacin, Gentamicin dan Ceftazidime pada Bakteri *E.coli***

Uji sensitivitas antibiotik pada penelitian ini melibatkan pengujian sensitivitas bakteri *E.coli* terhadap antibiotik Meropenem, Ciprofloxacin, Gentamicin, dan Cotrimoxazole menggunakan metode disc diffusion pada media MHA. Diameter Zone of Inhibition (ZOI) dalam mm di sekitar lempengan diskus antibiotik kemudian diukur dan hasilnya dikategorikan sesuai dengan ketentuan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Dari total 25 koloni bakteri *E.coli*, ditemukan bahwa beberapa bakteri resisten terhadap antibiotik Cotrimoxazole, sedangkan sebagian kecil resisten terhadap Meropenem dan Ciprofloxacin, tetapi tetap sensitif terhadap Gentamicin. Hasilnya menunjukkan bahwa 80% bakteri *E.coli* sensitif terhadap Meropenem, 16% intermediet, dan 4% resisten. Pada Ciprofloxacin, 88% bakteri *E.coli* sensitif, 8% intermediet, dan 4% resisten. Pada Cotrimoxazole, 72% bakteri *E.coli* masih sensitif dan 28% resisten. Sementara itu, pada Gentamicin, 100% bakteri *E.coli* sensitif. Hasil penelitian ini menyangkal penelitian sebelumnya bahwa bakteri *E.coli* yang resisten terhadap tembaga tidak selalu mengalami resistensi terhadap antibiotik tatalakasana utama *E.coli*. Sebagian besar koloni *E.coli* masih tergolong sensitif terhadap antibiotik tatalaksana utamanya (16).

Menurut penelitian sebelumnya, *E.coli* dapat mengembangkan mekanisme pertahanan terhadap antibiotik melalui faktor ekstrinsik dan intrinsik. Faktor ekstrinsik termasuk penggunaan antibiotik yang berlebihan atau tidak tepat dan paparan lingkungan seperti paparan logam berat, sedangkan faktor intrinsik melibatkan plasmid yang membawa gen resistensi. Plasmid memainkan peran penting dalam resistensi dengan memfasilitasi penyebaran gen resistensi ke sel lain. Sementara itu, bakteri juga dapat mengembangkan



resistensi dengan berbagai cara, seperti memproduksi enzim penghancur antibiotik, pompa efluks untuk membuang antibiotik, mengubah target antibiotik dalam sel, atau mengembangkan jalur metabolik alternatif. Gen resistensi terdapat baik dalam plasmid maupun kromosom, dan plasmid sering berkontribusi pada fenomena multidrug resistance dengan membawa gen resistensi terhadap berbagai antibiotik (4).

Tembaga (*Cuprum*), meskipun merupakan mikronutrien penting, dapat bersifat toksik dalam konsentrasi tinggi bagi sel bakteri. Paparan berlebihan terhadap tembaga dapat memicu kerusakan pada membran dan DNA bakteri melalui *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan reaksi kimia lainnya. Ini mengarah pada mekanisme adaptasi yang dikendalikan oleh regulator CueR, yang mengatur ekspresi gen seperti CueO dan CopA untuk mengatasi toksisitas tembaga. Overekspresi gen-gen ini meningkatkan produksi protein yang mendukung resistensi terhadap tembaga. Bakteri yang resisten terhadap tembaga berpotensi mengembangkan gen resisten terhadap antibiotik melalui *Multi Drug Efflux Pumps* melalui mekanisme *co-selection*, yang melibatkan *cross-resistance*. Hal ini dapat menyebabkan terbentuknya *Antibiotic Resistance Genes* (ARG) yang memungkinkan bakteri untuk mengembangkan resistensi terhadap antibiotik bersamaan dengan resistensi terhadap tembaga (6).

Akan tetapi hal tersebut tidak selalu terjadi, karena ada beberapa faktor lain yang mempengaruhi tidak terjadinya mekanisme *cross-resistance* adalah bahwa setiap bakteri memiliki berbagai gen yang berbeda, sehingga bakteri memiliki tingkat resistensi yang berbeda terhadap antibiotik atau logam berat. Selain itu, gen bakteri yang mengkode resistensi terhadap logam berat dan antibiotik dapat berada pada elemen genetik yang terpisah karena gen-gen ini tersebar di berbagai bagian genom bakteri, baik pada plasmid maupun kromosom, yang berarti resistensi tidak secara otomatis memengaruhi jenis resistensi lainnya (25).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, menunjukkan bahwa kadar Tembaga (*Cuprum*) dalam air limbah Pre-IPAL Rumah sakit tipe C di Malang adalah  $6,00 \pm 0,24$  mg/L, yang melebihi batas yang ditetapkan sebesar 2 mg/L. Hal ini menjadi peringatan agar ketika air limbah masuk ke IPAL mendapatkan perlakuan *eliminasi* logam berat tembaga lebih baik,

sehingga ketika air limbah keluar dari IPAL tidak melebihi baku mutu yang ditetapkan oleh peraturan Menteri lingkungan hidup Indonesia Nomor 5 Tahun 2014. Kultur bakteri *E.coli* dari air limbah ini menunjukkan resistensi terhadap Tembaga (*Cuprum*), dengan dosis optimum untuk pertumbuhan koloni bakteri sebesar 800 ppm. Analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p = 0,001$ ) dalam jumlah koloni antara media kontrol dan perlakuan. Menunjukkan bahwa Tembaga (*Cuprum*) mempengaruhi pertumbuhan *E.coli*. Uji sensitivitas antibiotik mengungkapkan bahwa sebagian besar koloni *E.coli* masih sensitif terhadap Cotrimoxazole, Gentamicin, Ciprofloxacin, dan Meropenem.

## SARAN

Penelitian ini memiliki kekurangan berupa paparan logam berat Tembaga (*Cuprum*) hanya dilakukan dalam onset akut tanpa onset kronis, pengambilan sampel yang hanya dilakukan pada Pre-IPAL, dan pengujian kadar logam berat hanya terfokus pada Tembaga (*Cuprum*) saja. Saran penelitian ini adalah untuk melakukan pengujian jangka panjang guna mengamati efek paparan tembaga terhadap resistensi bakteri *E.coli*. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat memperluas periode pengamatan sehingga diperoleh data yang lebih komprehensif mengenai dampak jangka panjang dari paparan tembaga. Selain itu, disarankan untuk membandingkan jumlah koloni *E.coli* yang diambil dari lokasi Pre-IPAL rumah sakit tipe C di Malang dengan Post-IPAL rumah sakit tipe C di Malang. Dan juga perlunya pengujian kadar logam berat lainnya. Sehingga pendekatan ini diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang hubungan antara kontaminasi logam berat dan perkembangan resistensi antibiotik pada bakteri patogen, serta memberikan kontribusi terhadap kebijakan pengelolaan limbah rumah sakit dan kesehatan masyarakat.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan kepada IOM yang telah memberikan pembiayaan dalam penelitian saya. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada laboran yaitu Ibu Nofie Irmalia Nurita, S.Si dan Ibu Arniyati, S.Si yang telah membantu penelitian saya secara teknis. Terima kasih juga saya ucapkan kepada Bapak Lukman Feda Maulana, S. KL yang telah membantu saya dalam pengambilan sampel penelitian ini, serta kepada Bapak Rio



Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD sebagai per-review

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Raoofi S, Kan Fp, Rafiei S, Hosseinipalangi Z, Mejareh Zn, Khani S, Et Al. Global Prevalence Of Nosocomial Infection: A Systematic Review And Meta-Analysis. Plos One. 2023 Jan 1;18(1 January).
2. Naelasari Dn, Koendhori Eb, Dewanti L, Sarassari R, Kuntaman K. The Prevalence Of Extended Spectrum Beta-Lactamase (Esbl) Producing Gut Bacterial Flora Among Patients In Dr. Soetomo Hospital And Primary Health Centre In Surabaya. Folia Medica Indonesiana. 2018 Dec 11;54(4):256.
3. Lépesová K, Olejníková P, Mackul'ak T, Cverenkárová K, Krahulcová M, Bírošová L. Hospital Wastewater—Important Source Of Multidrug Resistant Coliform Bacteria With Esbl-Production. Int J Environ Res Public Health. 2020 Nov 1;17(21):1–14.
4. Huda M. Resistensi Bakteri Gram Negatif Terhadap Antibiotik Di Uptd Balai Laboratorium Kesehatan Lampung Tahun 2012-2014. Jurnal Analis Kesehatan. 2016;5(1):494–503.
5. Virieux-Petit M, Hammer-Dedet F, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. From Copper Tolerance To Resistance In Pseudomonas Aeruginosa Towards Patho-Adaptation And Hospital Success. Vol. 13, Genes. Mdpi; 2022.
6. Bazzi W, Abou Fayad Ag, Nasser A, Haraoui Lp, Dewachi O, Abou-Sitta G, Et Al. Heavy Metal Toxicity In Armed Conflicts Potentiates Amr In A. Baumannii By Selecting For Antibiotic And Heavy Metal Co-Resistance Mechanisms. Vol. 11, Frontiers In Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2020.
7. Maulidya F, Rina Bintari Y, Risandiansyah R. Pengukuran Enterobacter Sp. Yang Diisolasi Dari Tanah Tpa Menggunakan Media Tersuplementasi Pb Dan Sensitivitas Terhadap Cefazolin Dan Gentamisin.
8. Hardianti F. Analisis Total Plate Count (Tpc) Mikroba Pada Ikan Asin Kakap Di Kota Sorong Papua Barat. Jurnal Biodjati [Internet]. 2018;3(1):72. Available From: [Http://Journal.Uinsgd.Ac.Id/Index.Php/Biodjati](http://journal.uinsgd.ac.id/index.php/biodjati)
9. Ni Wayan Sulastri, Ni Putu Pandawani, Ketut Widnyana, I Made Wahyu Wijaya. The Influence Of Sanitation And Hygiene Systems On The Existence Of Escherichia Coli Bacteria In Products Of Pindang Fish At Kusamba Centers, Klungkung, Bali. Advances In Tropical Biodiversity And Environmental Sciences. 2023 Oct 28;7(3):99–105.
10. Atlas Rm. Handbook Of Microbiological Media. Boca Raton, Fla.; 2010. 2036 P.
11. Setiabudi Rj, Puspitasari I. Antibiotics Quantity-Based Escherichia Coli Resistance Pattern In Patients At Surgical And Psychiatric Wards, Dr Soetomo Hospital, Surabaya. Folia Medica Indonesiana. 2014;50(2):104.
12. Permata Dewi A, Studi Sarjana Farmasi P, Farmasi Dan Ilmu Kesehatan Universitas Abdurrahman F, Studi Analisis Kesehatan P. Identifikasi Bakteri Patogen Mesofilik Pada Sumber Air Bersih Di Jalan Riau Ujung Kota Pekanbaru. Vol. 2, Jurnal Farmasi.
13. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society For Microbiology. 2009;15:55–63.
14. Wang J, Woo M, Yan C. Spot Plating Assay For The Determination Of Survival And Plating Efficiency Of Escherichia Coli In Sub-Mic Levels Of Antibiotics. Vol. 1. 2017.
15. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd Ed. Clinical And

- Laboratory Standards Institute, Usa; 2023.
16. Alam M, Imran Mohd. Screening And Potential Of The Incidence Of Resistance Transfer Among The Multidrug And Heavy Metal Resistant Gram-Negative Isolates From Hospital Effluents Of Northern India. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2018 Jul 5;13(2):164–79.
  17. O. M. Al-Dahmoshi H, M. J. Almamoori A, S. K. Al-Khafaji N. Investigation Of Cuscfba Pump Among Uropathogenic Escherichia Coli (Upec) Isolated From Women With Cystitis, Iraq. *Biosci Biotechnol Res Asia.* 2017 Mar 28;14(1):83–7.
  18. Menteri Lingkungan Hidup Republik Indonesia. Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2014 Tentang Baku Mutu Air Limbah . 2014;
  19. Teknologi Pengelolaan Air Bersih Dan Limbah Cair K, Pengkajian Dan Penerapan Teknologi Lingkungan P. Paket Teknologi Pengolahan Air Limbah Rumah Sakit Yang Murah Dan Efisien Oleh : Nusa Idaman Said. Vol. 2, Paket Teknologi Pengolahan Air Limbah Rumah Sakit ..... Jai. 2006.
  20. Akpor Ob. Heavy Metal Pollutants In Wastewater Effluents: Sources, Effects And Remediation. *Advances In Bioscience And Bioengineering.* 2014;2(4):37.
  21. Vargas It, Fischer Da, Alsina Ma, Pavissich Jp, Pablo P, Pizarro Ge. Copper Corrosion And Biocorrosion Events In Premise Plumbing. Vol. 10, *Materials.* Mdpi Ag; 2017.
  22. Wiegand I, Hilpert K, Hancock Rew. Agar And Broth Dilution Methods To Determine The Minimal Inhibitory Concentration (Mic) Of Antimicrobial Substances. *Nat Protoc.* 2008 Feb;3(2):163–75.
  23. Kirakosyan G, Trchounian A. Redox Sensing By Escherichia Coli: Effects Of Copper Ions As Oxidizers On Proton-Coupled Membrane Transport. *Bioelectrochemistry.* 2007 Jan;70(1):58–63.
  24. Christena Lr, Mangalagowri V, Pradheeba P, Ahmed Kba, Shalini Bis, Vidyalakshmi M, Et Al. Copper Nanoparticles As An Efflux Pump Inhibitor To Tackle Drug Resistant Bacteria. *Rsc Adv.* 2015;5(17):12899–909.
  25. Zhang S, Wang Y, Song H, Lu J, Yuan Z, Guo J. Copper Nanoparticles And Copper Ions Promote Horizontal Transfer Of Plasmid-Mediated Multi-Antibiotic Resistance Genes Across Bacterial Genera. *Environ Int.* 2019 Aug 1;129:478–87.