

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab berbagai penyakit mulai dari infeksi ringan hingga infeksi yang serius dengan prevalensi kasus yang tinggi (13-74%) secara global (Sahli, 2023). Menurut Fitrandi et al (2023) prevalensi infeksi akibat bakteri *S. aureus* di Indonesia telah mencapai 28%. Jumlah kasus resistensi mencapai 60,9% dari 23 kasus infeksi (Nuryah, et al., 2019). Resistensi antibiotik oleh *S. aureus* menyebabkan antibiotik tidak lagi efektif dalam membunuh bakteri dan dapat berujung pada kematian (Junaidi, 2019). Amoksisilin, yang merupakan antibiotik lini pertama untuk penanganan infeksi *S. aureus*, menunjukkan tingkat resistensi yang tinggi (mencapai 74%) (Ezeh, et al., 2023).

Untuk mengatasi masalah ini, pemanfaatan efek kombinasi senyawa kimia non-antibiotik terhadap antibiotik yang telah resisten dapat menjadi solusi yang menjanjikan. Beberapa penelitian telah melaporkan kombinasi senyawa non-antibiotik dengan antibiotik menunjukkan efek yang optimal dalam menghambat bakteri-bakteri resisten (Agustina, et al., 2020). Salah satu efek yang diharapkan dalam kombinasi obat yaitu efek sinergis. Efek sinergis merupakan efek gabungan yang lebih kuat dibandingkan efek individual, karena pembentukan kompleks tertentu yang menjadi lebih efektif dalam menghambat mikroorganisme, baik dalam mensintesis dinding sel maupun dengan menyebabkan lisis (Lubis, et al., 2020). Efek kombinasi antibiotik dan senyawa non-antibiotik dapat ditentukan dengan menggunakan perhitungan *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) yang menunjukkan karakteristik kombinasi dua senyawa antibakteri dalam menghambat bakteri, yang dapat bersifat sinergis, aditif, *indifferent* dan antagonis (Apridamayanti, et al., 2020). Selain itu, kemampuan kombinasi antibiotik dapat dilihat dari nilai faktor modulasi (MF). Modulasi merupakan proses yang mempengaruhi atau mengubah aktivitas antibakteri dengan meningkatkan atau mengurangi efektivitas agen antibakteri, dikatakan signifikan apabila nilai MF ≥ 4 atau terjadi pengurangan 4 kali lipat pada KHM antibiotik (Coelho et al., 2015).

Salah satu senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu riboflavin yang terbukti secara tunggal dapat menunjukkan efek antimikroba terhadap beberapa jenis mikroba patogen termasuk *S. aureus* (Ahgilan, et al., 2016). Sebuah penelitian menunjukkan bahwa riboflavin pada konsentrasi 50 $\mu\text{L}/\text{disk}$ memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* (Farah, et al., 2022). Pada penelitian tersebut juga dijelaskan bahwa riboflavin berinteraksi secara sinergis dengan obat antimalaria sedangkan interaksi antara riboflavin dengan artemisinin dan klorokuin bersifat aditif dan antagonis ringan. Namun, belum ada penelitian yang menguji efek kombinasi antara riboflavin dan

perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui efek dari kombinasi karena itu, penelitian ini difokuskan pada pengaruh kombinasi avin terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*.



I.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh kombinasi amoksisilin dan riboflavin terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*?
2. Apakah penambahan riboflavin dapat memodulasi aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap bakteri *S. aureus*?

I.3 Tujuan Penelitian

- 1 Untuk mengetahui pengaruh kombinasi amoksisilin dan riboflavin terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*.
3. Untuk mengetahui apakah penambahan riboflavin dapat memodulasi aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap bakteri *S. aureus*.



BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microplate 96-wells U-shape* (LabSelect®), mikropipet (Dragonlab®), inkubator (Mettler®), Mc Farland densitometer (Biosan®), autoklaf (All American Model 25X-2®), oven (Ecocell®), hot plate (Oxone®), *Biosafety Cabinet* (Thermo®), timbangan analitik (Sartorius®), vortex (Gemmy VM-300®), dan alat gelas lainnya.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah amoksisilin (Sigma-Aldrich®), riboflavin (Himedia®), biakan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, reagen Triphenyl-tetrazolium Chloride (TTC) (Himedia®), media Mueller Hinton Broth (Himedia®), media Mueller Hinton Agar (Merck®), Nutrient Agar (Merck®), *aquadest*, *aqua PA* (Onemed®), dan NaCl 0,9% steril (Otsu®).

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Sterilisasi alat

Seluruh alat dicuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas dan aluminum foil. Alat-alat gelas berskala dan alat-alat yang tidak tahan pemanasan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Adapun alat-alat gelas yang tidak berskala dan alat-alat yang tahan pemanasan disterilkan di oven pada suhu 170°C selama 1 jam. Sedangkan, jarum inokulasi yang akan digunakan disterilkan dengan cara dipijarkan pada nyala api (Earlia, *et al.*, 2023).

II.2.2 Penyiapan medium

Medium *Mueller Hinton Broth* dibuat dengan menimbang 1,05 g medium kemudian dilarutkan dengan air suling hingga 50 mL lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium *Mueller Hinton Agar* dibuat dengan menimbang 0,76 g medium kemudian dilarutkan dengan air suling lalu dipanaskan dan dicukupkan hingga 20 mL kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium *Nutrient Agar* dibuat dengan menimbang 0,2 g medium kemudian dilarutkan dengan air suling lalu dipanaskan dan dicukupkan 10 mL kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

II.2.3 Penyiapan bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan mengambil biakan *S. aureus* yang telah diremajakan sebanyak satu jarum inokulasi, lalu dimasukkan ke tabung reaksi berisi NaCl 0,9% steril 10 mL. Kemudian, dihomogenkan dengan vortex hingga kekeruhan setara dengan larutan McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Untuk uji mikrodilusi cair, dibutuhkan densitas biakan stok sebesar 10^6 CFU/mL sehingga, suspensi biakan



jaran faktor pengenceran 100x. Pengenceran 100x dibuat dengan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL ke dalam tabung berisi 9,9 mL NaCl diperoleh densitas biakan 10^6 CFU/mL.

larutan amoksisilin

amoksisilin disiapkan dengan melarutkan 0,05 g amoksisilin 1 mL kemudian diencerkan hingga konsentrasi 5 mg/mL. Setelah

itu dibuat 6 seri pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasinya 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,03125 mg/mL; dan 0,015625 mg/mL.

II.2.5 Pembuatan larutan riboflavin

Larutan uji riboflavin disiapkan dengan melarutkan 100 mg riboflavin menggunakan NaOH kemudian dicukupkan 2 mL dan diukur pH larutan tidak lebih dari 9 (digunakan HCl untuk menyesuaikan pH). Setelah itu, dibuat 6 seri pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi 50 mg/mL; 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6,25 mg/mL; 3,125 mg/mL; dan 1,5625 mg/mL.

II.2.6 Penentuan KHM tunggal dan kombinasi amoksisilin dan riboflavin

Uji KHM tunggal dilakukan dengan metode mikrodilusi cair menggunakan *microplate* 96 wells U-shape steril yang terdiri dari 12 kolom dan 8 baris dengan volume 200 μ L. Penentuan KHM tunggal amoksisilin terhadap *S. aureus* dilakukan dengan memasukkan setiap seri konsentrasi amoksisilin yang telah dibuat ke dalam *well plate*, masing-masing 20 μ L. Biakan bakteri *S. aureus* ditambahkan sebanyak 20 μ L (densitas akhir 10^5 CFU/mL) ke dalam 5 *well plate* yang berisi amoksisilin kemudian dicukupkan dengan 160 μ L media MHB. Penentuan KHM tunggal riboflavin terhadap *S. aureus* dilakukan dengan metode yang sama.

Penentuan KHM kombinasi amoksisilin dengan riboflavin terhadap *S. aureus* dilakukan dengan mengisi setiap seri konsentrasi amoksisilin dan riboflavin yang telah dibuat ke dalam *well plate* masing-masing 10 μ L. Biakan bakteri *S. aureus* ditambahkan sebanyak 20 μ L ke dalam *well plate* yang berisi kombinasi amoksisilin dan riboflavin kemudian dicukupkan dengan 160 μ L media MHB. Kontrol pelarut disiapkan dengan cara yang sama dengan penentuan KHM dengan menggunakan pelarut sebagai pengganti sampel. Selain itu, kontrol biakan dan kontrol media disiapkan dalam *well plate* dengan metode yang sama.

Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Setelah itu, setiap *well* ditetesi dengan 5 μ L TTC dan diinkubasi lagi selama 15 menit. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan perubahan warna menjadi merah muda setelah penambahan TTC, konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri merupakan nilai KHM (Watly *et al.*, 2023).

II.2.7 Uji penegasan

Uji penegasan dilakukan apabila sampel yang digunakan saat pengerjaan dari awal sudah keruh atau sampel berwarna. Uji dilakukan dengan mengambil 5 μ L ke dalam *well* menggunakan mikropipet dan ditusukkan ke media MHA padat. Kemudian, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam dan diamati. Hasil positif ditandai pertumbuhan bakteri pada cawan petri.



Faktor modulasi

Modulasi merupakan proses yang mempengaruhi atau mengubah dengan meningkatkan atau mengurangi efektivitas agen antibakteri, apabila nilai MF ≥ 4 atau terjadi pengurangan 4 kali lipat pada KHM modulasi dapat dihitung dengan rumus berikut :

$$MF = \frac{KHM \text{ antibiotik}}{KHM \text{ antibiotik} + \text{modulator}} \text{ (Kumar et al., 2022)}$$

II.2.9 Penentuan nilai *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI)

Nilai *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) merupakan indeks yang dapat menunjukkan karakteristik dari kombinasi antimikroba. Nilai FICI dapat dihitung menggunakan rumus di bawah ini (Apridamayanti *et al.*, 2020) dengan nilai A yaitu amoksisilin dan B yaitu riboflavin.

$$\sum FICI = \frac{MIC \text{ A dalam kombinasi}}{MIC \text{ A tunggal}} + \frac{MIC \text{ B dalam kombinasi}}{MIC \text{ B tunggal}} \text{ (Apridamayanti et al., 2020)}$$

Interpretasi nilai FICI dapat dilihat pada tabel di bawah:

Tabel 1. Karakteristik kombinasi berdasarkan nilai FICI (Donkor, *et al.*, 2023).

Nilai FICI	Karakteristik
$\leq 0,5$	Sinergis
$0,5 > x \leq 1$	Aditif
$1 > x \leq 4$	<i>Indifferent</i>
> 4	Antagonis

