

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, protozoa, atau beberapa kelompok minor lain (mikroplasma, riketsia, dan klamidia) dan merupakan penyebab utama penyakit di dunia terutama di daerah tropis seperti Indonesia karena temperature, dan kelembapan yang tinggi. Penyakit ini merupakan penyakit yang pathogen Dimana agen penyebab penyakit memiliki kemampuan untuk masuk, bertahan, dan berkembang biak di dalam tubuh. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Jewetz dkk., 2005).

Multi Drug resistant Pseudomonas aeruginosa (MDRPA) adalah kondisi Dimana bakteri resisten terhadap tiga atau lebih kelas antibiotic seperti penisilin, sefalosporin, monobactam, karbapenem, aminoglikosida, dan fluoroquinolon. Terapi pemberian antibiotic yang tidak tepat dan diberikan secara terus menerus menyebabkan *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap beberapa golongan antibiotic (Japoni., et al., 2009)

Infeksi MDR *Pseudomonas aeruginosa* menjadi lebih sulit diobati karena bakteri ini secara alami kebal terhadap banyak antibiotic dan jumlah strain yang resisten terhadap berbagai obat dan obat meningkat diseluruh dunia. Strain yang telah dilaporkan resisten terhadap hamper semua kelas antibiotic yang umum digunakan termasuk aminoglikosida, sefalosporin, fluoroquinolone daan karbapenem (Hancock and Speert, 2000; People, 2011; Eurosurveillance Editorial Team, 2013).

Pseudomonas aeruginosa merupakan suatu bakteri yang bersifat oportunistik, yaitu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada penderita apabila system kekebalannya menurun. *Pseudomonas aeruginosa* ini juga secara alami resisten terhadap berbagai antimikroba, kebanyakan antibiotika tidak efektif terhadap kuman ini. Bakteri ini meningkat secara klinik karena resisten terhadap beberapa jenis antibiotik. Resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat mengakibatkan lamanya waktu penyembuhan, meningkatkan resiko kematian, memperbanyak carrier di Masyarakat dan memperbanyak bakteri resisten (Utami, 2012). Peningkatan resisten bakteri terhadap antibiotik memberikan peluang besar untuk mendapatka senyawa antibakteri dengan memanfaatkan senyawa aktif dari kekayaan keanekaragaman hayati (Mpila dkk., 2012). Penggunaan tanaman obat semakin populer dan semakin meluas secara global seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan (Edy dkk., 2016).

Berdasarkan data WHO, presentase infeksi nosocomial di rumah sakit dunia mencapai 9% atau lebih dari 1,4 juta pasien rawat inap di rumah sakit seluruh dunia. Hal tersebut menunjukkan bahwa sekitar 8,7% dari 55 rumah sakit di 14 Negara yang berasal dari Eropa, Timur Tengah, Asia Tenggara dan Pasifik menunjukkan adanya infeksi nosocomial yang mencapai 10%. Di Amerika Serikat sekitar 13% dari infeksi *P. aeruginosa* disebabkan oleh multidrug strain resisten (Eurosurveillance Editorial Team, 2013). Di rumah sakit DKI Jakarta tahun 2004 menunjukkan bahwa 9,8% pasien rawat inap mendapat infeksi yang baru selama dirawat. Untuk mengatasi penyakit infeksi akibat *Pseudomonas aeruginosa* yang telah resisten, diperlukan suatu bahan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yaitu dengan menggunakan tanaman obat yang mengandung zat aktif pembunuh bakteri salah satunya adalah flavonoid. Flavonoid ini banyak terdapat pada tanaman, salah satunya pada daun, kulit serta biji Nangka (*Artocarpus*).

Salah satu tumbuhan yang sangat bermanfaat adalah Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) yang Dimana hampir seluruh bagian tanaman Nangka dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional, mulai dari daun, daging buah, biji Nangka, kayu, getah kulit batang dan kulit batang Nangka. Menurut hasil penelitian bahwa biji daunnya mengandung saponin, flavonoida, dan tanning (Candrika, 2006), biji

Nangka berkhasiat sebagai obat batuk, bagian kayu mengandung senyawa kimia yaitu morin, sianomaklurin, flavon dan tannin. Untuk bagian kulit batang Nangka berdasarkan hasil penelitian oleh (Ersam, 2001) terdapat senyawa fitokimia flavonoid yang baru seperti senyawa moursin, senyawa artonin E, sikloartobilosanton dan senyawa artonol B, Dimana senyawa flavonoid tersebut dapat bersifat sebagai antimikroba.

Ekstrak kulit batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) memiliki kandungan senyawa flavonoid, Dimana senyawa ini berdasarkan penelitian Patil dan Nikam (2013) bahwa kandungan flavonoid berperan sebagai antimikroba. Senyawa flavonoid pada ekstrak tanaman ini bersifat sebagai antibakteri dengan cara merusak dinding sel bakteri sehingga dapat menembus membrane sel dan menyebabkan inti sel mengalami lisis yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri (Pasaribu *et al.*, 2008) berbagai penelitian yang menggunakan ekstrak tanaman dalam Upaya mengatasi penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* telah banyak dilakukan. Namun penelitian mengenai kulit batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* belum banyak dilakukan, sehingga perlu dilakukan penelitian terkait pengujian ekstrak kulit batang Nangka dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Kandungan zat aktif dalam kulit batang nangka dapat diambil melalui metode ekstraksi menggunakan pelarut ethanol penelitian (Lee *et al.*, 2017). Etanol merupakan pelarut semi polar yang banyak digunakan untuk mengekstrak komponen polar suatu bahan alam dan dikenal sebagai pelarut universal. Oleh sebab itu pelarut yang digunakan untuk ekstraksi metode maserasi menggunakan pelarut etanol karena memiliki kemampuan yang baik untuk mengekstraksi senyawa fenolik pada tanaman, dibandingkan dengan methanol atau aseton, etanol lebih dipilih karena bersifat *food grade* dan *pharmaceutical grade*.

Untuk memperoleh senyawa aktif tersebut dapat dilakukan dengan mengisolasi senyawa aktif itu. Senyawa murni hasil isolasi dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi obat-obatan modern. Terdapat beberapa peralatan atau instrument laboratorium yang dapat digunakan untuk melakukan analisa kuantitatif dan kualitatif maupun untuk isolasi senyawa aktif dalam tanaman obat, salah satunya adalah LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*).

Berdasarkan uraian diatas, belum pernah dilaporkan aktifitas kulit batang nangka dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sehingga peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri ekstrak kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*) terhadap bakteri Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka rumusan masalah pada penelitian kali ini yaitu,

1. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak etanol Kulit Batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Apa saja senyawa aktif yang ada pada ekstrak etanol Kulit Batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dengan melakukan uji LC-MS dan moleculer docking.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Melakukan ekstraksi zat aktif Kulit Batang Nangka dengan pelarut etanol.
2. Melihat senyawa aktif yang ada pada kulit batang Nangka dengan uji LC-MS dan dilanjutkan *molecular docking*.
3. Mengukur diameter zona hambat ekstrak etanol Kulit Batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20%. terhadap pertumbuhan bakteri multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat pengemban ilmu

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi, menambah wawasan dan ilmu pengetahuan tentang manfaat ekstrak etanol kulit batang Nangka (*Artocarpus heteophyllus*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Serta mengembangkan kemampuan dalam pembuatan karya tulis ilmiah.

1.4.2. Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi dan informasi tentang manfaat ekstrak etanol kulit batang Nangka (*Artocarpus heteophyllus*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Nangka (*Artocarpus heterophyllus*)

Tanaman Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) merupakan salah satu jenis tanaman buah tropis yang multifungsi dan dapat ditanam di daerah tropis dengan ketinggian kurang dari 1.000 meter di atas permukaan laut yang berasal dari India Selatan. Ciri-ciri buah nangka yang sudah matang yaitu memiliki duri yang besar dan jarang, mempunyai aroma Nangka yang khas walaupun dari jarak yang lumayan jauh. Lalu setelah dipetik daging buahnya berwarna kuning sedar, tidak banyak mengandung getah. Buah tersebut bisa dimakan langsung ataupun diolah menjadi berbagai jenis masakan.

Pohon Nangka (*A. heterophyllus*) memiliki tinggi 10-15 m. batangnya tegak, berkayu bulat, kasar dan berwarna hijau kotor. Serta Daun *A. heterophyllus* memiliki Panjang 5-15 cm, lebar 4-5 cm, tangkai Panjang kurang lebih 2 cm, tunggal, bersling, lonjong, memiliki tulang daun yang menyirip, daging daun tebal, tepi rata, ujung runcing, dan berwarna hijau. Bunga Nangka merupakan bunga majemuk yang berebntuk bulir berada di ketiak daun dan berwarna kuning. Bunga Jantan dan betinya terpisah dengan tangkai yang memiliki cincin bunga Jantan ada di batang baru diantara daun atau diatas bunga betina. Buah berwarna kuning Ketika matang, oval, dan berbiji coklat muda. (Heyne, 1987)

Daun pohon Nangka dapat digunakan sebagai pelancar ASI serta obat pada luka luar. Daging buah Nangka muda dapat juga dimanfaatkan sebagai makanan sayuran yang mengandung albuminoid dan karbohidrat.

Biji Nangka dapat diolah menjadi tepung yang digunakan sebagai bahan baku industry makanan. Khasiat kayu sebagai antispasmodic dan sedative, daging buah sebagai ekspektron, daun sebagai laktagog. Getah kulit juga telah digunakan sebagai obat demam dan juga sebagai antiinflamasi. Pohon Nangka juga dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Kandungan kimia dalam kayu adalah morin, sianomaklurin (zat samak), flavonoid dan tannin. Selain itu dikulit kayunya juga terdapat senyawa flavonoid yang baru yaitu morusin, artonim E, sikloartobilosanton, dan artonol B. Bioaktivitasnya terbukti secara empiric sebagai anti kanker, antivirus, antiinflamasi, diuretik, dan antihipertensi (Ersam, 2001).

Flavonoid merupakan salah satu senyawa aktif pada tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri (Abdul, 2008). Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Khan *et al* 2003), ekstrak methanol kulit batang Nangka (*A. heterophyllus*) memiliki kadar flavonoid sebagai senyawa antibakteri. Mekanisme kerja flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membrane sel bakteri. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membrane sel tanpa dapat diperbaiki lagi. Biji Nangka (*A. heterophyllus*) mengandung senyawa golongan flavonoid (Patel *et al*, 2011).

Senyawa flavonoid mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hydrogen sehingga struktur tersier protein terganggu dan protein tidak dapat berfungsi lagi sehingga terjadi denaturasi protein dan asam nukleat. Denaturasi tersebut menyebabkan koagulasi protein serta mengganggu metabolisme dan fungsi fisiologis bakteri. (Heni, Savante dan Anita, 2015).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri lingkungan Gram negative dan ada Dimana-mana. Bakteri ini merupakan bakteri patogen oportunistik pada manusia dan mampu menyebabkan beraneka ragam penyakit infeksi akut dan kronis yang mengancam jiwa terutama pada pasien dengan pertahanan tubuh yang sedang terganggu. *Pseudomonas aeruginosa* ini sendiri dapat menimbulkan infeksi pada

saluran pernafasan, kantung kemih, telinga, kulit dan pada luka. Bakterinya dapat ditemukan di dalam sputum, urine, darah, feces, pus, secre telinga, dan juga di dalam makanan, minuman, dan air (Jawetz, 1986).

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram-negatif dan berada di mana-mana. Ini merupakan bakteri patogen oportunistik pada manusia dan mampu menyebabkan beraneka ragam penyakit infeksi akut dan kronis yang mengancam jiwa, terutama pada pasien dengan pertahanan daya tahan tubuh yang lemah.(Soedarto,2015)

Kehadiran di mana-mana *Pseudomonas aeruginosa* serta prevalensi dan persistensinya di lingkungan klinis termasuk resistensi intrinsik terhadap terapi dikaitkan dengan kemampuan bertahan hidup yang luar biasa dengan merekrut gudang mekanisme responsif. Meningkatnya prevalensi infeksi *Pseudomonas aeruginosa* MDR (*Multidrug Resistant*) memiliki banyak jenis mekanisme resistant antibiotik, termasuk resistant terhadap beta-laktamase, produksi enzim *extended-spectrum beta-lactamase*, modifikasi porin yang spesifik untuk *karbepenem*, sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* yang paling resistant *amikasin* dan *gentamisin* yaitu golongan *aminoglikosida*. Namun *amikasin* tidak terlalu sering dipakai dikarenakan resiko pada ginjal dan harganya yang mahal (El Zowalaty et al., 2015).

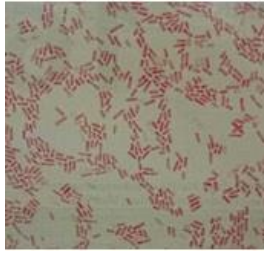
2.2.1. Klasifikasi

Klasifikasi *Pseudomonas sp* menurut Bergey's (1994) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Prokaryota</i>
Division	: <i>Gracilicutes</i>
Class	: <i>Schizomycetes</i>
Family	: <i>Pseudomonadaceae</i>
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Species	: <i>P. Aeruginosa</i>

2.2.2. Morfologi

Pseudomonas aeruginosa bersifat motil dan berbentuk batang, dengan ukuran sekitar 0.6 x 2 µm. Bakteri ini tergolong kelompok bakteri gram negative dan dapat muncul dalam bentuk Tunggal, berpasangan atau kadang-kadang dalam bentuk rantai pendek dan dapat bergerak (motil) karena adanya satu flagel (Brooks et al, 2013). Bakteri ini dapat hidup dan berkembang dalam keadaan tanpa oksigen. Isolate *Pseudomonas aeruginosa* dapat membentuk tiga macam koloni (Soekiman. 2016). Isolate yang berasal dari baham klinis menghasilkan koloni berukuran besar, halus, dengan tepi yang datar dan bagian Tengah menonjol, mirip telur dadar, sedangkan isolate berasal dari sekresi respirasi dan sekresi saluran kemih berbentuk mucoid dan berlendir.



Gambar 2.1 Morfologi *Pseudomonas aeruginosa* dengan pembesaran 1.000x (Nugroho, 2010)

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri obligat aerob yang mudah tumbuh pada berbagai medium kultur, kadang-kadang menghasilkan aroma yang manis dan berbau seperti anggur atau jagung taco. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni yang bundar dan licin dengan warna kehijauan yang berfluoresensi. Bakteri ini sering menghasilkan pigmen kebiruan tak berfluoresensi dan piosianin yang berdifusi ke dalam agar. Spesies *Pseudomonas* lainnya tidak menghasilkan piosianin (Soekiman, 2016).

Pseudomonas aeruginosa tumbuh dengan baik pada suhu 37-42 C. kemampuannya untuk tumbuh pada suhu 42 C membantu membedakannya dari species *Pseudomonas* lain dari grup fluorsens. Bakteri bersifat oksidase positif. *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi karbohidrat, tetapi mengoksidasi glukosa. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* biasanya didasarkan pada morfologi koloni (Nugroho, 2010).

Meningkatnya prevalensi infeksi *Pseudomonas aeruginosa* MDR (*Multidrug Resistent*) memiliki banyak jenis mekanisme resistam antibiotic termasuk resisten terhadap beta-laktamase AmpC, produksi enzim *extend-spectrum beta-lactamase*, modifikasi porin yang spesifik untuk karbapenem, sensitivitas *P. aeruginosa* yang paling resisten amikasin dan gentamisin yaitu golongan aminoglikosida. Namun amikasin tidak terlalu sering di gunakan dikarenakan resiko pada ginjal dan harganya yang relative mahal. (El Zowalaty et al, 2015).

Infeksi *P. aeruginosa* menjadi lebih sulit diobati karena bakteri ini secara alami kebal terhadap banyak antibiotic dan jumlah strain yang resisten terhadap berbagai obat meningkat di seluruh dunia. Strain yang telah dilaporkan resisten terhadap hampir semua kelas antibiotic yang umum digunakan termasuk aminoglikosida, sefalosporin, fluoroquinolone, dan karbapenem.

Di Amerika sekitar 13% dari infeksi *Pseudomonas aeruginosa* disebabkan oleh multidrug strain resisten. Kemunculan bakteri pathogen yang bersifat oportunistik seperti *P. aeruginosa*, dimulai dengan adanya gangguan atau kelainan dari system pertahanan tubuh yang normal.

Bakteri ini menempel dan membentuk koloni pada membrane mukosa atau kulit, menginvasi secara local dan meyebabkan penyakit sistemik (Brook et al, 2013).

2.2.3. Epidemiologi

Pseudomonas aeruginosa umumnya hidup di tanah, air, dan tumbuhan. Bakteri ini ditemukan di kulit beberapa orang sehat dan telah diisolasi dari tenggorokan (5 persen) dan tinja (3 persen) pasien yang tidak dirawat di rumah sakit. Angka penularan melalui gastrointestinal meningkat pada pasien yang dirawat di rumah sakit hingga 20 persen dalam waktu 72 jam setelah masuk rumah sakit. Di dalam rumah sakit, *P. aeruginosa* ditemukan di banyak tempat penampungan: disinfektan, peralatan pernapasan, makanan, wastafel, keran, dan kain pel. Selain itu, bakteri ini terus-menerus masuk

kembali ke lingkungan rumah sakit melalui buah-buahan, tanaman, sayuran, dan pasien yang dipindahkan dari fasilitas lain. Penyebaran terjadi dari pasien ke pasien melalui tangan petugas rumah sakit, melalui kontak langsung pasien dengan tempat penampungan yang terkontaminasi, dan melalui konsumsi makanan dan air yang terkontaminasi.

2.2.4. Manifestasi Klinis dan Patogenitas

Pseudomonas aeruginosa menyebabkan berbagai penyakit. Infeksi lokal setelah pembedahan atau luka bakar umumnya menyebabkan bakteremia umum dan seringkali berakibat fatal. Infeksi saluran kemih setelah masuknya *P. aeruginosa* pada kateter atau dalam larutan irigasi bukanlah hal yang jarang terjadi. Lebih jauh lagi, kebanyakan pasien fibrosis kistik mengalami kolonisasi kronis dengan *P. aeruginosa*. Pasien fibrosis kistik jarang mengalami bakteremia *P. aeruginosa*, karena tingginya kadar antibodi *P. aeruginosa* yang bersirkulasi. Akan tetapi, kebanyakan pasien fibrosis kistik akhirnya meninggal karena infeksi *P. aeruginosa* lokal. *Pneumonia P. aeruginosa* nekrotikans dapat terjadi pada pasien lain setelah penggunaan respirator yang terkontaminasi.

Pseudomonas aeruginosa dapat menyebabkan infeksi kornea yang parah setelah pembedahan mata atau cedera. Bakteri ini ditemukan dalam kultur murni, khususnya pada anak-anak dengan infeksi telinga tengah. *Pseudomonas aeruginosa* dan *P. maltophilia* merupakan penyebab 80 persen infeksi oportunistik yang disebabkan oleh pseudomonad. Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* merupakan masalah serius pada pasien yang dirawat di rumah sakit karena kanker, fibrosis kistik, dan luka bakar; tingkat kematian kasusnya adalah 50 persen. Infeksi lain yang disebabkan oleh spesies *Pseudomonas* meliputi endokarditis, pneumonia, dan infeksi saluran kemih, sistem saraf pusat, luka, mata, telinga, kulit, dan sistem muskuloskeletal.

Pseudomonas aeruginosa menjadi patogenik bila berada di daerah yang fungsi pertahannya abnormal, misalnya selaput kulit yang rusak karena kerusakan jaringan langsung pada pemakaian kateter pembuluh darah atau saluran kencing pada neutropenia seperti khemotrapi kanker. Pada bakteri dapat menyerang atau menempel pada selaput lendir dan kulit, dapat menyebar dari tempat dan mengakibatkan penyakit sistemik. Dan pada proses tersebut dapat dipercepat oleh pili, enzim, dan toksin (Jawet dkk, 2014).

2.2.5. Mekanisme Resistensi

Pseudomonas aeruginosa memiliki berbagai mekanisme resistensi, di antaranya adalah penurunan penetrasi antibiotik ke dalam sel, perubahan target antibiotik, dan inaktivasi antibiotik oleh enzim. Berbagai mekanisme resistensi ini dapat dikelompokkan menjadi intrinsik, didapat, dan adaptif (Gellatly & Hancock, 2013).

2.2.5.1. Resistensi Intrinsik

Resistensi intrinsik adalah resistensi alami suatu organisme terhadap antibiotik tertentu. Antibiotik ini tidak dapat membunuh seluruh atau hampir seluruh spesies bakteri tersebut. *P. aeruginosa* resisten secara intrinsik terhadap ampisilin, amoksisilin-asam klavulanat, sefazolin, sefotaksim, seftriakson, ertapenem, kloramfenikol, tigesiklin, kanamisin, dan neomisin. Antibiotik-antibiotik ini tidak boleh digunakan karena akan menyebabkan kegagalan terapi (Leclercq et al., 2013). Resistensi intrinsik *P. aeruginosa* terhadap antibiotik dapat disebabkan oleh penurunan permeabilitas membran luar, sistem pompa, dan adanya enzim perusak-antimikroba.

1. Penurunan Permeabilitas Membran Luar

Membran luar sel *P. aeruginosa* merupakan lapisan yang bersifat semipemeabel. Berbagai nutrisi penting seperti gula, asam amino, fosfat, dan siderofor masuk ke dalam sel melalui kanal-kanal yang disebut porin. Antibiotik yang bersifat hidrofilik, seperti beta-laktam, aminoglikosida, tetrasiklin, fluorokuinolon, dan karbapenem juga masuk ke dalam sel melalui kanal-kanal ini (Lister et al., 2009).

2. Enzim AmpC

Sebagian besar enzim perusak-antimikroba yang dimiliki oleh *P. aeruginosa* dikode dan disebarkan dari satu bakteri ke bakteri lainnya melalui plasmid kecuali AmpC, yaitu enzim sefalosporinase yang bersifat inducible (dapat diinduksi) dan terletak di dalam kromosom (Peter-Getzlaff et al., 2011). *P. aeruginosa* strain liar (*wild type*) menghasilkan enzim AmpC dalam jumlah kecil (*low level basal*) dan tetap sensitif terhadap antibiotik antipseudomonas golongan penisilin, kombinasi penisilin inhibitor beta-laktamase, sefalosporin, dan karbapenem (Lister et al., 2009). *P. aeruginosa* akan menjadi resisten terhadap seluruh antibiotik beta-laktam, kecuali sefalosporin generasi ke-4 dan karbapenem bila enzim AmpC dihasilkan dalam jumlah yang besar (*over-produced*) (Lister et al., 2009).

2.2.5.2. Resistensi Didapat (*Acquired Resistance*)

Resistensi didapat akan menyebabkan *P. aeruginosa* resisten terhadap antibiotik golongan beta laktam, aminoglikosida, dan kuinolon (Gellatly & Hancock, 2013).

1. Enzim Beta-Laktamase

Kelas A : Enzim yang termasuk kelas ini adalah karbenisilinase dan *extended-spectrum beta-lactamases* (ESBL). Antibiotik yang menjadi substrat enzim karbenisilinase adalah karboksipenisilin dan ureidopenisilin (mis. piperasilin). *P. aeruginosa* penghasil enzim karbenisilinase menunjukkan kepekaan yang beragam terhadap sefepim, sefpirom, dan aztreonam dan tetap peka terhadap seftazidim dan karbapenem (Strateva & Yordanov, 2009). Berbeda dari *P. aeruginosa* penghasil enzim karbenisilinase, strain penghasil enzim ESBL tidak hanya resisten terhadap karboksipenisilin dan ureidopenisilin saja, tetapi juga terhadap sefalosporin spektrum luas (seftazidim, sefepim, sefpirom) dan aztreonam. Secara *in vitro*, enzim ini dihambat oleh asam klavulanat dan tazobactam (Strateva & Yordanov, 2009).

Kelas B (Metallo-Beta-Laktamase): Enzim beta-laktamase kelas B disebut juga karbapenemase. Enzim ini memiliki 4 famili, yaitu IMP, VIM, SPM, dan GIM (Strateva & Yordanov, 2009). Keberadaan enzim karbapenemase tengah menjadi perhatian saat ini karena menyebabkan *P. aeruginosa* resisten terhadap seluruh antibiotik golongan penisilin, sefalosporin, dan karbapenem. Resistensi *P. aeruginosa* terhadap karbapenem juga dapat disebabkan oleh tipe *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (Meletis & Bagkeri, 2013).

Kelas D (Oksasilinase) : Enzim oksasilinase (OXA) klasik (OXA-1, OXA-2, OXA-10) menyebabkan *P. aeruginosa* resisten terhadap karboksipenisilin dan ureidopenisilin. Sementara itu oksasilinase spektrum luas menyebabkan *P. aeruginosa* resisten terhadap sefotaksim, sefepim, sefpirom, dan aztreonam.

2. Enzim Perusak Aminoglikosida (*Aminoglycoside-Modifying Enzymes* [AMEs])

Enzim perusak-aminoglikosida (AMES) dibawa dan disebarkan melalui berbagai genetic mobile *elements* seperti plasmid, transposon, dan integron. Enzim ini menyebabkan *P. aeruginosa* menjadi resisten terhadap hampir seluruh antibiotik golongan aminoglikosida (Pang et al., 2019). AMEs dibagi menjadi 3 kelompok enzim, yaitu *aminoglycoside phosphoryltransferase* (APHs),

aminoglycoside adenylyl-transferases (AADs) atau *nucleotidyltransferases* (ANTs), dan *aminoglycoside acetyltransferases* (AACs). AMEs yang paling sering dihasilkan oleh *P. aeruginosa* adalah AAC(6')-II dan AAC(3)-II yang menyebabkan bakteri ini menjadi resisten terhadap gentamisin, tobramisin, dan netilmisin; AAC(3)-I terhadap gentamisin; dan AAC(6')-I terhadap tobramisin, netilmisin, dan amikasin (Strateva & Yordanov, 2009).

2.3. Uji Kepekaan Antibakteri

Uji kepekaan merupakan suatu cara mikrobiologi yang rutin dilakukan untuk membantu para klinis dalam memberikan pengobatan yang tepat pada penderita. Secara umum uji kepekaan dapat diartikan sebagai berikut: Konsentrasi hambat minimum yaitu konsentrasi terendah antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Tujuan menguji kepekaan bakteri adalah untuk mengetahui potensi zat antibakteri terhadap suatu bakteri dan untuk mengetahui kepekaan mikroorganisme terhadap obat pada konsentrasi tertentu (Gupte, 1996), Uji kepekaan ini dapat dilakukan dengan metode standar menggunakan obat sebagai pembanding. Untuk uji kepekaan tersebut dapat dilakukan dengan 2 cara salah satunya yaitu:

2.4. Antibiotik

Bahan kimia alami atau sintetik yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme disebut sebagai bahan antimikroba. Agen yang dapat membunuh mikroorganisme disebut agen sidal (*cidal agent*) yang meliputi bakterisidal, fungisidal, dan virisidal. Sedangkan agen yang hanya mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebut agen statis (*static agent*) yang meliputi bakteristatik, fungistatik, dan viristatik.

Agen antimikroba dapat berupa disinfektan, antiseptik maupun antibiotik. Antibiotik merupakan suatu agen antimikroba yang diproduksi secara alami oleh mikroorganisme lain. Isolasi sintesis dan penggunaan antibiotik dalam analisis penyakit akibat mikroorganisme patogen sangatlah penting karena dapat digunakan untuk mengetahui sensitivitas mikroorganisme terhadap antibiotik tertentu.

Bahan kimia alami atau sintetik yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme disebut sebagai bahan antimikroba. Agen yang dapat membunuh mikroorganisme disebut agen sidal (*cidal agent*) yang meliputi bakterisidal, fungisidal dan virisidal. Sedangkan agen yang hanya mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebut agen statis (*static agent*) yang meliputi bakteristatik, fungistatik dan viristatik. Agen antimikroba dapat berupa disinfektan, antiseptik maupun antibiotik. Antibiotik merupakan suatu agen antimikroba yang diproduksi secara alami oleh mikroorganisme dan dalam jumlah sangat sedikit dapat membunuh mikroorganisme lain. Isolasi sintesis dan penggunaan antibiotik dalam analisis penyakit akibat mikroorganisme patogen sangatlah penting karena dapat digunakan untuk mengetahui sensitivitas mikroorganisme terhadap antibiotik tertentu (Pelczar dan Chan, 1988).

Aktivitas antibakteri suatu senyawa terhadap suatu mikroba uji pada metode cakram kertas dibuktikan dengan adanya respon penghambatan pertumbuhan mikroba yang ditandai dengan halo (daerah bening sekitar kertas cakram). Aktivitas antimikroba dapat digunakan untuk menentukan nilai MBC (*Minimal Inhibitor Concentration*) atau konsentrasi terendah suatu agen antimikroba yang diperlukan membunuh perkembangan pertumbuhan mikroba secara nyata pada kadar minimum setelah diinkubasi selama waktu yang ditentukan (Pelczar dan Chan, 1998).

Pada penelitian ini, peneliti akan menggunakan pembanding control positif berupa paper disk yang sudah berisi gentamicin yang sudah dilarutkan. Control positif ini digunakan untuk melihat perbandingan diameter zona hambat bakteri dan untuk control negatif yang digunakan adalah

Aquades steril yang tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri. Control positif gentamicin digunakan karena gentamicin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida. Hal ini efektif terhadap gram positif dan gram negative. Dianggap sebagai antibakteri, gentamicin memiliki potensi menengah. Gentamicin bersifat bakterisid yang efektif terhadap berbagai strain kuman gram negative termasuk spesies *Pseudomonas*. (Daniel, 2004).

2.4.1. Penggolongan Antibiotik

2.4.1.1. Golongan Penisilin

Penisilin diklasifikasikan sebagai obat β -laktam karena cincin laktam mereka yang unik. Mereka memiliki ciri-ciri kimiawi, mekanisme kerja, farmakologi, efek klinis, dan karakteristik imunologi yang mirip dengan sefalosporin, monobactam, carbapenem, dan β -laktamase inhibitor, yang juga merupakan senyawa β -laktam. Penisilin dapat terbagi menjadi beberapa golongan:

1. Penisilin natural (misalnya, penisilin G)

Golongan ini sangat poten terhadap organisme gram-positif, coccus gram negatif, dan bakteri anaerob penghasil *non- β -laktamase*. Namun, mereka memiliki potensi yang rendah terhadap batang gram negatif (Katzung, 2007). Spektrum golongan ini untuk mikroorganisme gram-positif aerobik. Penisilin G 5-10 kali lebih aktif melawan *Neisseria spp*, dan beberapa bakteri anaerob. Cepat dihidrolisis oleh penisilinase sehingga tidak efektif terhadap kebanyakan galur *S. aureus* (Goodman & Gilman, 2010).

2. Penisilin isoksazolil (misalnya oksasilin, kloksasilin dan diklosasin)

Penisilin jenis ini resisten terhadap stafilokokus β -laktamase. Golongan ini aktif terhadap organisme gram positif seperti stafilokokus dan streptokokus tetapi tidak aktif terhadap enterokokus, bakteri anaerob, dan kokus gram negatif dan batang gram negatif (Katzung, 2007). Golongan ini sangat stabil dalam media asam dan diabsorpsi secara memadai setelah pemberian oral. Obat ini bukan pengganti penisilin G untuk pengobatan penyakit yang biasa diatasi oleh penisilin G (Goodman & Gilman, 2010). Sifat farmakologisnya adalah penisilin ini secara kuat menghambat pertumbuhan sebagian besar stafilokokus penghasil- penisilinase. Diklosasin adalah penisilin yang paling aktif. Obat-obat ini kurang efektif melawan mikroorganisme yang rentan terhadap penisilin G dan tidak berguna melawan bakteri gram-negatif (Goodman & Gilman, 2010).

3. Penisilin Antipseudomonal (misalnya karboksipenisilin dan ureidopenisilin)

Karboksipenisilin, karbenisilin dan tikarsilin, aktif terhadap *P. aeruginosa* dan beberapa *Proteus spp*. Obat ini lebih lemah daripada ampisilin dan turunannya. Obat-obat tersebut tidak efektif terhadap sebagian besar galur *S. Aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* dan *L. Monocytogenes*. *B. Fragilis* rentan terhadap kadar tinggi obat ini, tetapi penisilin G lebih aktif.

Ureidopenisilin, mezlosilinn dan piperasilin, mempunyai aktivitas yang unggul terhadap *P. Aeruginosa* dibandingkan karbesilin dan tikarsilin. Mezlosilin dan piperasilin juga berguna untuk infeksi *Klebsiella*. Karboksipenisilin dan ureidopenisilin sensitif terhadap destruksi oleh β -laktamase (Goodman & Gilman, 2010).

4. Penisilin dengan spektrum yang diperluas (Ampisilin dan Penisilin antipseudomonas)

Golongan ini memiliki aktivitas antimikroba yang lebih luas, termasuk mikroorganisme gram-negatif tertentu, seperti *Haemophilus influenza*, *Escherichia coli* dan *Proteus mirabilis* (Goodman & Gilman, 2010). Obat ini mempertahankan spektrum antibakterial penisilin dan mengalami peningkatan aktivitas terhadap bakteri gram negatif (Katzung, 2007). Sifat farmakologis ampisilin

adalah diabsorpsi baik setelah pemberian oral. Asupan makanan sebelum konsumsi ampisilin mengurangi absorpsinya. Ampisilin mengalami sirkulasi enterohepatik dan diekskresi dalam jumlah cukup besar dalam feses. Amoksisilin berhubungan erat dengan ampisilin, obat ini diabsorpsi lebih cepat dan lengkap di GI dari ampisilin. Spektrum amoksisilin sangat identik dengan ampisilin, kecuali bahwa amoksisilin kurang efektif untuk sigelosis. Sifat farmakologis amoksisilin adalah kadar puncak dalam plasma dua kali lebih besar daripada ampisilin setelah pemberian oral pada dosis yang sama. Makanan tidak mengganggu absorpsi. Mungkin karena absorpsi lebih baik, insiden diare akibat amoksisilin lebih kecil daripada ampisilin. Sebagian besar antibiotik ini diekskresi dalam bentuk aktif dalam urine. Sifat farmakologisnya adalah penisilin ini secara kuat menghambat pertumbuhan sebagian besar stafilokokus penghasil- penisilinase. Dikloksasin adalah penisilin yang paling aktif. Obat-obat ini kurang efektif melawan mikroorganisme yang rentan terhadap penisilin G dan tidak berguna melawan bakteri gram-negatif (Goodman & Gilman, 2010).

2.4.1.2. Golongan Sefalosporin dan sefamisin

Sefalosporin mirip dengan penisilin secara kimiawi, cara kerja, dan toksisitas. Hanya saja sefalosporin lebih stabil terhadap banyak beta-laktamase bakteri sehingga memiliki spektrum yang lebih lebar. Mekanisme kerja sefalosporin dan sefamisin yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara yang sama seperti penisilin. Sefalosporin tidak aktif terhadap bakteri enterokokus dan *L. monocytogenes*. Sefalosporin terbagi dalam beberapa generasi, yaitu:

a. Sefalosporin generasi pertama

Sefalosporin generasi pertama termasuk di dalamnya sefadroxil, sefazolin, sefaleksin, sefalotin, sefafirin, dan sefradin. Obat - obat ini sangat aktif terhadap kokus gram positif seperti *pneumococcus*, *streptococcus viridan*, dan grup *streptococcus A hemolitikus* dan *S. aureus* rentan terhadap golongan ini. Sebagian besar anaerob mulut bersifat sensitif, tetapi kelompok *B. Fragilis* bersifat resisten (Goodman & Gilman, 2010).

b. Sefalosporin generasi kedua

Anggota dari sefalosporin generasi kedua, antara lain: sefaklor, sefamandol, sefanisid, sefuroxim, sefprozil, loracarbef, dan seforanid. Secara umum, obat-obat generasi kedua memiliki spektrum antibiotik yang sama dengan generasi pertama. Hanya saja obat generasi kedua mempunyai spektrum yang diperluas kepada bakteri gram negatif, tetapi kurang aktif daripada sefalosporin generasi-ketiga (Goodman & Gilman, 2010). Semua sefalosporin generasi kedua aktif melawan *B. Fragilis*. Golongan ini kurang aktif terhadap enterokokus atau *P aeruginosa*. (Katzung, 2007).

c. Sefalosporin generasi ketiga

Obat-obat sefalosporin generasi ketiga adalah sefoperazone, sefotaxime, seftazidime, seftizoxime, seftriaxone, sefixime, seftibuten, moxalactam, dll. Obat generasi ketiga memiliki spektrum yang lebih diperluas kepada bakteri gram negatif dan dapat menembus susunan saraf pusat (Katzung, 2007). Obat golongan ini kurang aktif dari generasi-pertama melawan kokus gram-positif, tetapi jauh lebih aktif terhadap Enterobacteriaceae, termasuk galur penghasil β - laktamase (Goodman & Gilman, 2010).

d. Sefalosporin generasi keempat

Obat golongan ini adalah sefepim, memiliki spektrum aktivitas lebih luas dibandingkan dengan generasi ketiga dan tahan terhadap hidrolisis oleh β - laktamase. Golongan ini sangat berguna untuk pengobatan empiris infeksi serius pada pasien rawat inap jika mikroorganisme gram-positif,

Enterobacteriaceae, dan *Pseudomonas* merupakan penyebab yang potensial (Goodman & Gilman, 2010).

2.4.1.3. Golongan Antibiotik β -laktam lain (Karbapenem)

Obat ini adalah golongan β -laktam yang mempunyai spektrum yang lebih luas daripada kebanyakan antibiotik β -laktam lainnya.

a. Imipenem

Obat ini memiliki aktivitas antimikroba seperti β -laktam lain, terikat pada PBP, mengganggu sintesis dinding sel bakteri, dan menyebabkan kematian pada mikroorganisme yang rentan. Imipenem sangat resisten terhadap hidrolisis oleh kebanyakan β -laktamase. Aktivitasnya sangat baik untuk berbagai macam mikroorganisme aerob dan anaerob (Goodman & Gilman, 2010).

b. Meropenem

Meropenem merupakan derivat tienamisin yang tidak membutuhkan pemberian bersama silastatin karena tidak sensitif terhadap dipeptidase ginjal. Toksisitas dan efikasi klinisnya mirip dengan imipenem. Kecuali bahwa meropenem lebih kecil menyebabkan *seizure*.

c. Ertapenem

Berbeda dengan imipenem dan meropenem karena mempunyai $t_{1/2}$ serum yang lebih lama yang memungkinkan dosis sehari dan aktivitasnya lebih rendah terhadap *P. aeruginosa* dan *Acinetobacter* spp. Spektrum aktivitasnya terhadap organisme gram-positif (Goodman & Gilman, 2010).

d. Aztreonam

Aztreonam merupakan β -laktam monosiklik. Aztreonam resisten terhadap β laktamase yang dihasilkan oleh sebagian besar bakteri gram-negatif. Memiliki aktivitas hanya terhadap bakteri gram-negatif, tidak aktif terhadap bakteri gram-positif dan anaerob. Aktivitasnya baik terhadap *P. aeruginosa* dan sangat aktif terhadap *H. Influenzae* dan gonokokus (Goodman & Gilman, 2010).

2.4.1.4. Golongan Kloramfenikol

Kloramfenikol merupakan inhibitor yang poten terhadap sintesis protein mikroba. Kloramfenikol bersifat bakteriostatik dan memiliki spektrum luas dan aktif terhadap masing-masing bakteri gram positif dan negatif baik yang aerob maupun anaerob (Katzung, 2007).

2.4.1.5. Golongan Tetrasiklin

Golongan tetrasiklin merupakan obat pilihan utama untuk mengobati infeksi dari *M. pneumoniae*, klamidia, riketsia, dan beberapa infeksi dari spirokaeta. Tetrasiklin juga digunakan untuk mengobati ulkus peptikum yang disebabkan oleh *H. pylori*. Tetrasiklin menembus plasenta dan juga diekskresi melalui ASI dan dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan tulang dan gigi pada anak akibat ikatan tetrasiklin dengan kalsium. Tetrasiklin diekskresi melalui urin dan cairan empedu (Katzung, 2007)

2.4.1.6. Golongan Makrolida

Golongan makrolida, antara lain: eritromisin, roksitromisin, azitromisin dan klaritromisin. Eritromisin merupakan bentuk prototipe dari obat golongan makrolida yang disintesis dari *S. erythreus*. Eritromisin efektif terhadap bakteri gram positif terutama pneumokokus, streptokokus,

stafilokokus, dan korinebakterium. Aktifitas antibakterial eritromisin bersifat bakterisidal dan meningkat pada pH basa (Katzung, 2007).

2.4.1.7. Golongan Aminoglikosida

Yang termasuk golongan aminoglikosida, antara lain: streptomisin, neomisin, kanamisin, tobramisin, sisomisin, netilmisin, dan lain lain. Golongan aminoglikosida pada umumnya digunakan untuk mengobati infeksi akibat bakteri gram negatif enterik, terutama pada bakteremia dan sepsis, dalam kombinasi dengan vankomisin atau penisilin untuk mengobati endokarditis, dan pengobatan tuberkulosis (Katzung, 2007).

2.4.2. Mekanisme Kerja

Terdapat beberapa cara kerja dari antibiotik. Cara yang paling penting adalah penghalangan sintesis protein, sehingga kuman musnah atau tidak dapat berkembang (Tjay, 2007).

2.5. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Multidrug Resistant berarti terhadap lebih dari satu agen antimikroba tetapi tidak ada definisi standar MDR telah disetujui oleh komunitas medis. Banyak definisi digunakan untuk mengkarakterisasi pola resistensi multidrug di Gram-positif dan Gram-negatif organisme (Hidron AI et al, 2007., MacGowan, 2008., Paterson DL, 2006).

Pseudomonas aeruginosa adalah penyebab utama infeksi nosokomial dan bertanggung jawab atas 10% dari seluruh infeksi yang didapat di rumah sakit. Infeksi yang disebabkan oleh *P. aeruginosa* seringkali parah dan mengancam nyawa serta sulit diobati karena terbatasnya kerentanan terhadap agen antimikroba dan tingginya frekuensi munculnya resistensi antibiotik selama terapi, sehingga mengakibatkan dampak buruk yang parah. Tempat isolasi MDR *P. aeruginosa* yang paling umum adalah luka (39%), diikuti oleh saluran pernapasan (22%) dan saluran kemih (18%) (Aloush Valerie, 2006).

Metode lain yang digunakan untuk mengkarakterisasi bakteri sebagai MDR adalah ketika mereka resisten terhadap satu agen antimikroba utama. Isolate bakteri ini mungkin memiliki Kesehatan Masyarakat penting karena resisten hanya terhadap satu antimikroba utama agen tetapi mereka sering menunjukkan perlawanan silang atau kebersamaan terhadap beberapa kelas antimikroba yang menjadikannya MDR. Membuat akronim bakteri berdasarkan ketahanannya terhadap agen antimikroba utama.

Pseudomonas aeruginosa resisten terhadap hampir semua antibiotik termasuk *karbapanem* 2-3%. *P. aeruginosa* yang resisten terhadap *karbapanem* membawa elemen genetik yang membuat enzim *karbapanemase*, enzim ini membuat antibiotik tidak efektif sehingga elemen genetik seluler dengan mudah terbagi di antara bakteri dan dengan cepat menyebarkan resistensi (CDC's, 2019).

Secara literal, MDR berarti tahan terhadap lebih dari satu agen antimikroba, tetapi tidak ada definisi standar untuk MDR telah disetujui oleh komunitas medis. Banyak definisi digunakan untuk mengkarakterisasi pola resistensi multidrug di Gram-positif dan Gram-negatif organisme (Falagas ME et al, 2006; Cohen AL et al, 2008; Hidron AI et al, 2007; MacGowan, 2008; Paterson DL, 2006).

Metode lain yang digunakan untuk mengkarakterisasi bakteri sebagai MDR adalah ketika mereka resisten terhadap satu agen antimikroba utama (Hidron AI et al, 2007; Siegel JD et al, 2007). Isolat bakteri ini mungkin memiliki kesehatan masyarakat penting karena resistensi hanya terhadap satu antimikroba utama agen, tetapi mereka sering menunjukkan perlawanan silang atau kebersamaan

terhadap beberapa kelas antimikroba, yang menjadikannya MDR. Membuat akronim bakteri berdasarkan ketahanannya terhadap agen antimikroba utama.

2.6. LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass-Spectrometry*)

LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) merupakan sebuah teknik analisis yang menggabungkan dari kemampuan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrofotometri massa. Data dari sebuah LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) digunakan untuk memberikan informasi seperti struktur, berat molekul kuantitas dan identitas komponen dari sampel tertentu, dan senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel isebut fase diam, elusi pelarut melalui kolom disebut fase gerak (Himawan, 2010).

Penggabungan MS dengan LC (LC-MS) merupakan perluasan yang jelas tetapi kemajuan di bidang ini terbatas selama bertahun-tahun karena ketidakcocokan relatif dari sumber ion MS yang ada dengan aliran cairan yang kontinyu. Beberapa antarmuka dikembangkan tetapi rumit untuk digunakan dan tidak dapat diandalkan, sehingga penyerapan oleh laboratorium klinis sangat terbatas. Situasi ini berubah dengan perkembangan sumber ion elektro spray oleh Fenn pada tahun 1980-an.¹ Produsen dengan cepat mengembangkan instrumen yang dilengkapi dengan sumber semprotan listrik, yang berdampak besar pada biokimia protein dan peptida. Fenn dianugerahi Hadiah Nobel pada 2002 bersama Koichi Tanaka yang mengembangkan ionisasi laser desorpsi berbantuan matriks, teknik ionisasi MS lain yang sangat berguna untuk analisis molekul biologis. Pada pertengahan 1990-an, harga dan kinerja instrumen LCMS telah meningkat sejauh laboratorium biokimia klinis dapat memanfaatkan teknologi baru (Pitt, 2009).

Cara umum, kromatografi cair (LC) memisahkan komponen sampel berdasarkan perbedaan afinitas (atau kekuatan retensi) untuk fase stasioner atau fase gerak, kemudian mendeteksi komponen yang terpisah menggunakan UV, fluoresensi, atau konduktivitas listrik berdasarkan sifat-sifatnya. Detektor-detektor tersebut terutama memenuhi syarat zat berdasarkan waktu retensi dan waktu substansi berdasarkan intensitas puncak dan daerah puncak. Kromatografi menawarkan resolusi yang bagus, tetapi zat yang mengkuantifikasi dan mengidentifikasi secara akurat dapat menjadi sulit jika beberapa komponen mengelusi kurang lebih pada saat yang sama. Sebaliknya, spektrometri massa (MS) menawarkan teknik mendeteksi yang sangat sensitive mengionisasi komponen sampel menggunakan berbagai metode, kemudian memisahkan ion yang dihasilkan dalam ruang hampa berdasarkan rasio massa ke muatan dan mengukur intensitas masing-masing ion. Karena spektrum massa yang disediakan oleh MS dapat menunjukkan tingkat konsentrasi ion yang memiliki masa tertentu. Itu karena massa adalah informasi khusus untuk molekul tertentu dan MS memungkinkan memperoleh informasi itu secara langsung.

Oleh karena itu, system LC-MS menggabungkan resolusi pemisahan kromatografi cair yang luar biasa dengan kemampuan kualitatif spektrometri massa yang luar biasa. Spektrum massa yang diperoleh dari pengukuran pemindaian ini memberikan informasi massa molekul dan structural untuk komponen eluted, yang melengkapi informasi kualitatif berdasarkan waktu retensi yang diperoleh dengan menggunakan detektor LC lain. Selain itu pengukuran SIM (Selected Ion Monitoring) mendeteksi substansi berdasarkan massa, yang merupakan parameter yang sangat selektif (Heriyanto, 2017)

Prinsip dari LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) yaitu pemisahan analit-analit berdasarkan kepolaran, alat terdiri dari kolom untuk fase diam, larutan tertentu untuk fase gerak. Campuran analit nanti terpisah sesuai dengan kepolaran dan kecepatan untuk sampai di detektor atau waktu retensinya akan berbeda, dan teramati di spektrum puncak-puncak terpisah (Himawan, 2010).

Fase gerak cair diberi bantuan pompa yang dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan dengan cara penyuntikan ke aliran fase gerak. Dalam kolom tersebut terjadi pemisahan komponen campuran dikarenakan terdapat perbedaan kekuatan interaksi dari fase diam dengan larutan. Larutan dengan dengan fase diam dengan interaksi kurang kuat itu keluar terlebih dahulu dari kolom. Larutan yang berinteraksi dengan fase diam itu keluar kolom, lalu dideteksi oleh detektor, direkam bentuknya yaitu kromatogram (Isnawati, 2013). Keuntungan dari LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) ini adalah dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti polaritas tinggi, senyawa termal labil, bermassa molekul tinggi, protein (Himawan, 2010).

Keuntungan dari LC-MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein. Komponen elusi dari kolom kromatografi kemudian diteruskan ke spectrometer massa melalui antar muka khusus. Prinsipnya adalah pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya, alatnya terdiri atas kolom (sebagai fasa diam) dan larutan tertentu sebagai fasa geraknya tekanan tinggi digunakan untuk mendorong fasa gerak. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolarannya dan kecepatannya untuk sampai ke detektor (waktu retensinya) akan berbeda, hal ini akan teramati pada spektrum yang puncak-puncaknya terpisah bantuan pompa fasa gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran, karena perbedaan kekuatan interaksi antara larutan terhadap fasa diam. Larutan yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih dulu. Sebaliknya, larutan yang kuat berinteraksi dengan fasa diam maka larutan tersebut akan keluar kolom, kemudian dideteksi oleh detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram (Sahidin, 2019).

Ada berbagai keunggulan LC-MS dibandingkan metode kromatografialainnya, di antaranya adalah sebagai berikut (Kumar, 2016);

1. Selektivitas: puncak co-eluting dapat diisolasi dengan selektivitas massa dan tidak dibatasi oleh resolusi kromatografi.
2. Penugasan puncak: sidik jari molekuler untuk senyawa yang diteliti dihasilkan, memastikan penetapan puncak yang benar dengan adanya matriks kompleks.
3. Informasi berat molekul: konfirmasi dan identifikasi senyawa yang dikenal dan tidak diketahui.
4. Informasi struktural: fragmentasi terkontrol memungkinkan penjelasan structural bahan kimia.
5. Pengembangan metode cepat menyediakan identifikasi analit yang dielusidengan mudah tanpa validasi waktu retensi.
6. Kemampuan beradaptasi matriks sampel: Mengurangi waktu persiapan sampel dan karenanya menghemat waktu.

Kuantitasi: data kuantitatif dan kualitatif dapat diperoleh dengan mudah dengan pengoptimalan instrument terbatas.

2.7. Penentuan Aktivitas Antimikroba

Potensi dari suatu antimikroba diperkirakan dengan membandingkan zona hambat pertumbuhan terhadap mikroorganisme yang sensitif dari hasil penghambatan suatu konsentrasi larutan uji dibandingkan dengan antibiotik (Fauziah, 2015).

Menurut pratiwi (dalam Prima, 2012) Penentuan aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode difusi dan metode dilusi. Pada metode difusi termasuk didalamnya metode *disk diffusion* (tes Kirby & Baur), *E-test*, *ditch-plate technique*, *cup plate technique*. Pada metode dilusi termasuk didalamnya metode dilusi cair dan dilusi padat.

2.7.1. Metode Difusi

1. Metode *disk diffusion* (tes Kirby & Baur) menggunakan piringan yang berisi agen antimikroba, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Saraswati, 2015).

2. Metode *E-test* digunakan untuk menghitung MIC (*minimum inhibitory konsentras*), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah sampai tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme sebelumnya. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkan yang menunjukkan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar (Sariadji, 2019)

2.7.2. Metode Dilusi (Pengenceran)

Metode dilusi merupakan metode penentuan aktivitas antibakteri dengan kadar antibakteri menurun secara bertahap, menggunakan media cair atau media padat. Metode dilusi ini prosesnya membutuhkan waktu yang lama dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja. Dasar penentuan antimikroba secara *in vitro* adalah nilai MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). MIC merupakan konsentrasi terendah bakteri yang dapat menghambat bakteri dengan melihat hasil yang ditunjukkan adanya koloni yang tumbuh pada agar atau kekeruhan pada media cair. Sedangkan nilai MBC adalah konsentrasi terendah antimikroba yang dapat membunuh 99,9% mikroba pada biakan selama waktu yang ditentukan (Yolla Arinda Nur Fitriana, 2019).

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah dilusi. Prinsip metode dilusi adalah substansi antimikroba dalam kadar bertingkat dicampurkan ke dalam medium bakteriologis solid atau cair. Metode dilusi dapat digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) yang ditentukan dengan cara melihat kekeruhan pada tabung uji.

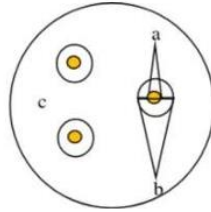
Keuntungan metode dilusi adalah bahan uji metode dilusi cair lebih mudah berinteraksi dengan bakteri karena suspensi bakteri tersebar merata sehingga metode ini lebih peka. Keuntungan lainnya yaitu memungkinkan adanya hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme yang diuji (Jawetz., et al, 2008).

MIC dapat digunakan untuk menentukan tingkat resistensi dan sebagai petunjuk penggunaan antimikroba. Nilai MIC senyawa antimikroba yang lebih rendah menunjukkan bakteri lebih sensitif terhadap senyawa tersebut (Yolla Arinda Nur Fitriana, 2019). Sedangkan penentuan konsentrasi minimum antibiotik yang dapat membunuh bakteri (MBC) dilakukan dengan cara menginokulasi bakteri pada pembenihan cair yang digunakan untuk MIC ke dalam agar kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. MBC ditandai dengan apabila sudah tidak terjadi pertumbuhan mikroba lagi pada agar (Yolla Arinda Nur Fitriana, 2019).

2.8. Pengukuran zona hambat

Aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening disekeliling kertas cakram. Bagian yang dihitung dengan jangka sorong adalah diameter dari zona

hambat yang terbentuk Saraswati (2015) Diameter zona hambat dideskripsikan dengan gambar dibawah ini:



Gambar 2.2. Diameter Zona Hambat

Keterangan:

- a = Diameter kertas cakram (6 mm)
- b = Diameter zona hambat yang terbentuk (mm)
- c = Daerah yang ditumbuhi bakteri

Menurut Suryawiria (dalam Pradana, 2014), berdasarkan zona hambat yang terbentuk maka aktivitas antibakteri dapat digolongkan menjadi beberapa golongan yaitu antibakteri yang tergolong lemah (zona hambat < 5 mm), sedang (zona hambat antara 5-10 mm), kuat (zona hambat antara 10-20 mm), dan tergolong sangat kuat (zona hambat > 20 mm).

2.9. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan tidak larut yang berbeda. Tujuan ekstraksi itu sendiri yaitu untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, Dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut.

Ekstraksi dengan pelarut dapat digolongkan menjadi cara dingin dan cara panas. Cara dingin meliputi ekstraksi secara maserasi dan perlokasi, sedangkan cara panas meliputi ekstraksi secara soxhletasi, refluks, digesti, infusa dan dekok. (Mozer, 2015).

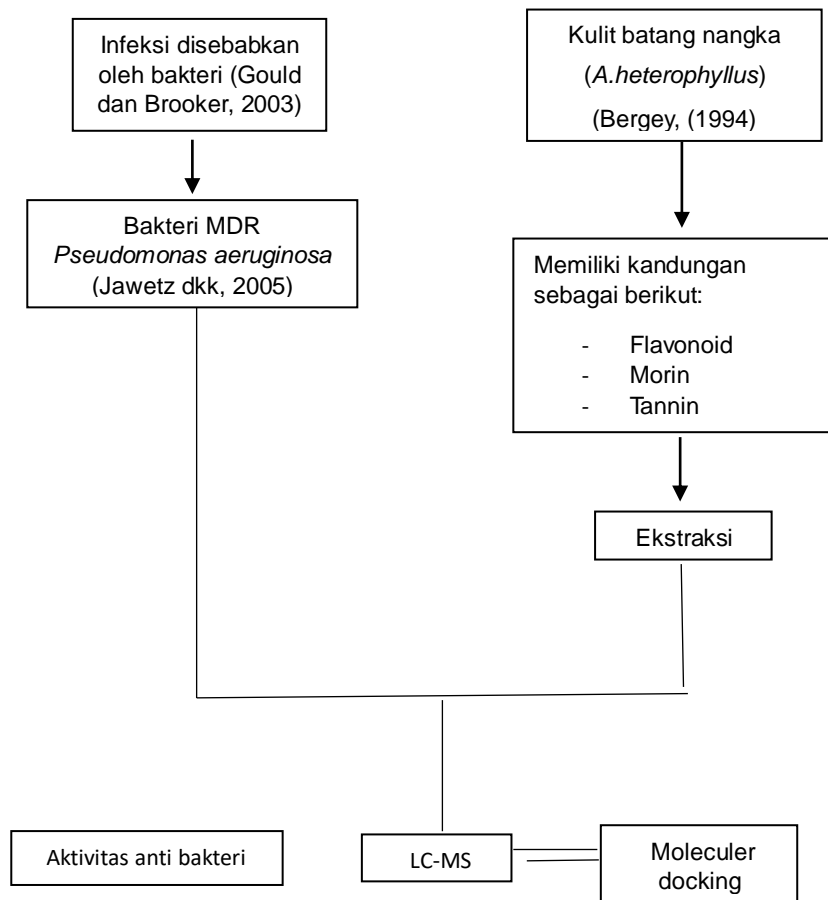
2.9.1. Maserasi

Maserasi yaitu proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperature ruangan disebut ekstraksi cara dingin maserasi. Metode maserasi merupakan proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan. Proses maserasi ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel dan tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membrane sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel. Sehingga metabolic sekunder yang ada didalam senyawa akan terlarut dalam pelarut organik. Pelarut proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Lenny, 2006)

2.10. Moleculer Docking

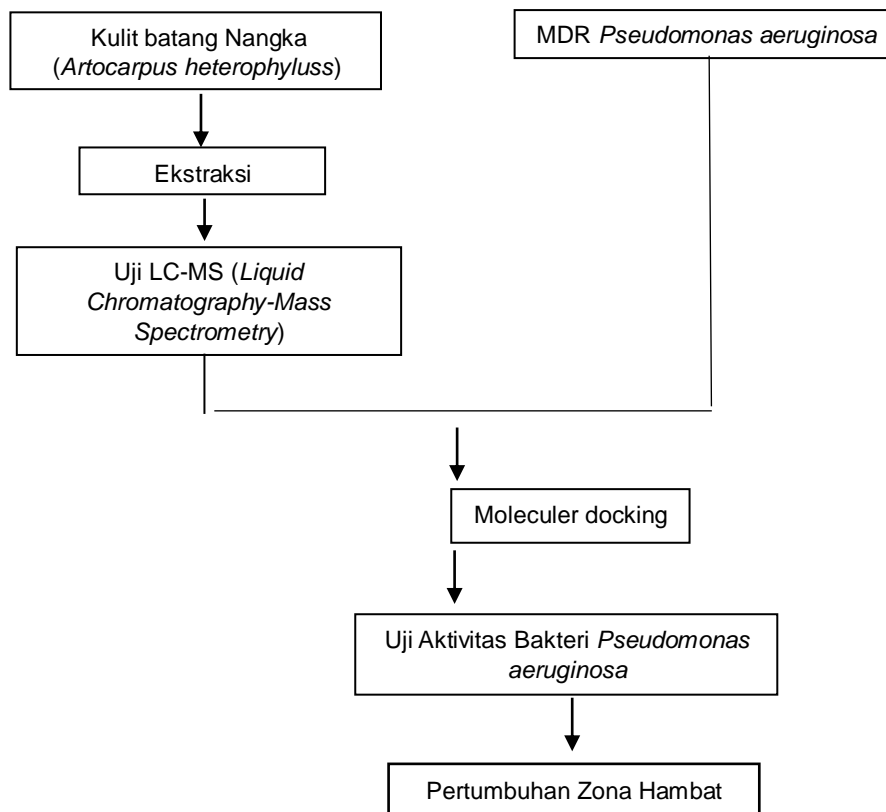
Molecular docking bertujuan menganalisis *binding site* dan *binding affinity* untuk memperoleh informasi potensi senyawa-senyawa yang terkandung dalam Ekstrak kulit Batang Nangka dalam menghambat aktivitas protein GyrB. Analisis situs pengikatan dan ikatan kimia yang terbentuk antara protein dan ligan dilakukan menggunakan perangkat lunak Biovia Discovery Studio 2019 (Dassault Systèmes Biovia, San Diego, California, USA).

2.11. Kerangka Teori



Gambar 2.3. Kerangka Teori

2.12. Kerangka Konsep



Gambar 2.4. Kerangka Konsep

2.13. Hipotesis

- Ho = Ekstrak etanol kulit batang Nangka tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap MDR *Pseudomonas aeruginosa*.
- H1 = Ekstrak etanol kulit batang Nangka memiliki aktivitas antibakteri terhadap MDR *Pseudomonas aeruginosa*.