

**PENGARUH METFORMIN TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
AMOKSISILIN PADA *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO***



**MAWAR AMELIA YOSANTO
N011 22 1118**



**PROGRAM STUDI SARJANA
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2026**

**PENGARUH METFORMIN TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI AMOKSISILIN PADA *Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO***

**MAWAR AMELIA YOSANTO
N011 22 1118**



**PROGRAM STUDI SARJANA
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2026**

**PENGARUH METFORMIN TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI AMOKSISILIN PADA *Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO***

MAWAR AMELIA YOSANTO
N011 22 1118

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI SARJANA
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2026**

SKRIPSI
PENGARUH METFORMIN TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI AMOKSISILIN PADA *Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO*

MAWAR AMELIA YOSANTO
N011 22 1118

Skripsi,

telah dipertahankan di depan panitia Ujian Sarjana Farmasi pada
tanggal dan dinyatakan telah memenuhi syarat
kelulusan
pada

Program Studi SARJANA
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:
Pembimbing tugas akhir,



Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19900602 201504 2 002

Mengetahui
Ketua Program Studi,



Andi Ajiuna, S.Si., M.Na.Sc.T., Ph.D., Apt.
NIP. 19850404 201012 1 005

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Pengaruh Metformin Terhadap Aktivitas Antibakteri Amoksisilin Pada *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.



Makassar, 12 Maret 2026

Mawar

MAWAR AMELIA YOSANTO
N011 22 1118

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur atas ke hadirat Allah *Subhanahu a Ta'ala* atas segala berkah, rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik sebagai syarat dalam memperoleh gelar sarjana pada program studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Penyusunan tugas akhir ini tidak dapat terselesaikan tanpa adanya bimbingan, arahan, bantuan, serta dukungan dari berbagai pihak. Dengan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih dengan hati yang tulus kepada :

1. Ibu Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt., selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran serta bantuan bagi penulis dalam penelitian dan penyusunan tugas akhir.
2. Ibu Prof. Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. dan Bapak Muhammad Nur Amir, S.Si., M.Si., Apt., selaku dosen penguji yang telah bersedia untuk meluangkan waktunya serta memberikan masukan dan saran bagi penulis terkait penelitian dan penyusunan tugas akhir.
3. Ibu Nur Inda Yanti, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang telah banyak memberikan semangat, motivasi, saran, serta bersedia meluangkan waktunya bagi penulis untuk dapat berkonsultasi selama berkuliah di Fakultas Farmasi.
4. Dekan, seluruh jajaran dosen, serta seluruh staff Fakultas Farmasi yang telah banyak memberikan ilmu dan fasilitas yang memadai selama penulis menjalani studi di Farmasi.
5. Kedua orang tua yang sangat saya kasihi dan cintai, Ayahanda Johan Yosanto dan Ibunda Santi Irwena yang selalu ada disemua situasi atas doa, semangat, nasehat, dan dukungannya selama ini yang telah banyak berjuang untuk penulis dapat menempuh pendidikan yang setinggi-tingginya.
6. Kakak dan adik yang sangat saya sayangi dan banggakan, Riyo Febrian Yosanto dan Brian Yosanto yang telah banyak membantu dan selalu ada untuk penulis baik senang maupun susah selama ini.
7. Sahabat-sahabat penulis yaitu Hanifah Syafira Akham Arfan, Lulu Wulandari Kusuma R, A. Rehanum Alfatih Hawa, dan Christabella J.E.Tanujaya yang selalu memberikan semangat dan bantuan kepada penulis selama menempuh pendidikan.
8. Teman-teman penelitian saya yaitu Gufi, Manaf, dan Kifah yang telah kebersamai dan menyemangati penulis sejak awal penelitian hingga selesai. Serta, teman-teman Korps Asisten Mikrobiologi Farmasi terkhususnya 'KELUARGA MIKRO ADUDUW' yang telah banyak membantu dan menghibur penulis selama proses perkuliahan, penelitian, hingga penyusunan tugas akhir.
9. Kepada *kpop group* 'SEVENTEEN' yang secara tidak langsung telah menghibur penulis melalui berbagai konten dan lagu-lagunya.
10. *Last but not least*, terima kasih kepada Mawar Amelia Yosanto yang telah bertahan dan bertanggung jawab untuk menyelesaikan apa yang telah dimulai atas pilihannya sendiri. Terima kasih karena memilih untuk terus berusaha, belajar, dan tidak menyerah meskipun tidak sesuai dengan apa yang kamu inginkan.

Penulis,



Mawar Amelia Yosanto

ABSTRAK

MAWAR AMELIA YOSANTO **Pengaruh Metformin Terhadap Aktivitas Antibakteri Amoksisilin Pada *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*** (dibimbing oleh Nana Juniarti Natsir Djide)

Latar belakang. Bakteri *Staphylococcus aureus* menjadi masalah yang sangat serius karena peningkatan resistensi bakteri ini terhadap berbagai jenis antibiotik. Modulasi aktivitas antibiotik melalui kombinasi antibiotik dengan obat non-antibiotik dapat menjadi alternatif penanganan masalah resistensi tersebut. Metformin dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme, salah satunya bakteri *S. aureus*, sehingga, dapat menjadi kandidat agen modulator. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metformin terhadap aktivitas antibakteri amoksisilin pada *S. aureus*. **Metode.** Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan menggunakan metode mikrodilusi *checkerboard assay*. Amoksisilin diuji dalam lima tingkat konsentrasi, yaitu 1 µg/mL hingga 0,0625 µg/mL, sedangkan metformin digunakan pada rentang 500 µM/mL sampai 31,25 µM/mL. Seluruh larutan uji disiapkan melalui pengenceran bertahap dua kali lipat. Nilai *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) serta Faktor Modulasi (FM) dihitung berdasarkan perbandingan KHM pada penggunaan tunggal dan kombinasi. **Hasil.** Hasil penelitian memperlihatkan bahwa nilai KHM amoksisilin sebagai agen tunggal sebesar 0,5 µg/mL, sedangkan metformin tunggal tidak dapat menghambat pada semua rentang konsentrasi larutan uji. Pada penggunaan secara kombinasi, KHM amoksisilin menurun menjadi 0,0625 µg/mL dan KHM metformin menjadi 125 µM/mL. Perhitungan selanjutnya menunjukkan nilai faktor modulasi sebesar 8 dan indeks konsentrasi hambat fraksional sebesar $\leq 0,375$. **Kesimpulan.** Metformin terbukti mampu meningkatkan aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap *S. aureus*, serta kombinasi dari keduanya menunjukkan adanya interaksi sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri tersebut.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, amoksisilin, metformin, FICI, faktor modulasi

ABSTRACT

MAWAR AMELIA YOSANTO **Effect of Metformin on the Antibacterial Activity of Amoxicillin Against *Staphylococcus aureus* In Vitro** (supervised by Nana Juniarti Natsir Djide)

Background. *Staphylococcus aureus* has become a significant concern because of its increasing resistance to various antibiotics. Modulating antibiotic activity using a combination of antibiotics and non-antibiotic drugs may be an alternative approach to address this resistance problem. Metformin has been reported to inhibit the growth of various microorganisms, including *S. aureus*, therefore, making it a potential modulator agent. **Objective.** This study aimed to determine the effect of metformin on the antibacterial activity of amoxicillin against *S. aureus*. **Methods.** The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined using a checkerboard microdilution assay. Amoxicillin was tested at five concentration levels ranging from 1 µg/mL to 0.0625 µg/mL, and metformin concentrations ranged from 500 µM/mL to 31.25 µM/mL. All test solutions were prepared using a two-fold serial dilution method. The Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) and Modulation Factor (MF) were calculated based on the MIC values obtained from the single and combined treatments. **Results.** The results showed that the MIC of amoxicillin alone was 0.5 µg/mL, whereas metformin alone did not exhibit inhibitory activity across the tested concentration range. In combination, the MIC of amoxicillin decreased to 0.0625 µg/mL, and that of metformin was 125 µM/mL. Further analysis revealed a modulation factor of 8 and a fractional inhibitory concentration index of 0.375. **Conclusion.** Metformin was shown to enhance the antibacterial activity of amoxicillin against *S. aureus*, and their combination demonstrated a synergistic interaction in inhibiting bacterial growth.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, amoxicillin, metformin, FICI, modulation factor

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENEGASAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Rumusan Masalah	2
I.3 Tujuan Penelitian	2
BAB II. METODE PENELITIAN.....	3
II.1 Alat dan Bahan.....	3
II.2 Metode Kerja.....	3
II.2.1 Sterilisasi alat	3
II.2.2 Pembuatan medium	3
II.2.3 Penyiapan bakteri uji.....	3
II.2.4 Pembuatan larutan uji amoksisilin.....	4
II.2.5 Pembuatan larutan uji metformin.....	4
II.2.6 Penentuan konsentrasi hambat minimum amoksisilin.....	4
II.2.7 Penentuan konsentrasi hambat minimum metformin	4
II.2.8 Penentuan konsentrasi hambat minimum amoksisilin dan metformin.....	4
II.2.9 Penentuan nilai faktor modulasi (FM).....	5
II.2.10 Penentuan nilai konsentrasi fraksional (Fractional Inhibitory Concentration Indeks/FICI) kombinasi amoksisilin dan metformin	5
II.3 Analisis data	6
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	7
III.1 Hasil	7
III.1.1 Penentuan nilai KHM tunggal dan kombinasi amoksisilin dan metformin	7
III.1.2 Penentuan nilai FM dan FICI.....	8
III.2 Pembahasan	8
III.2.1 Penentuan nilai KHM tunggal dan kombinasi amoksisilin dan metformin	8
III.2.2 Penentuan nilai FM dan FICI.....	9
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN.....	11
4.1 Kesimpulan.....	11
4.2 Saran	11
DAFTAR PUSTAKA.....	13
LAMPIRAN.....	15

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Hasil penentuan nilai FM dan FICI	8
2. Hasil Uji KHM	20
3. Kategori interpretasi dan ambang atas KHM <i>Staphylococcus</i> spp.	20
4. Komposisi Medium <i>Tryptic Soy Agar</i>	21
5. Komposisi Medium <i>Mueller-Hinton Broth</i>	21

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Hasil uji konsentrasi hambat minimum amoksisilin dan metformin	7
2. Skema uji KHM tunggal dan kombinasi replikasi I	16
3. Skema uji KHM kombinasi replikasi II dan III	16
4. Penyiapan alat dan bahan	21
5. Pembuatan medium.....	21
6. Sterilisasi alat dan bahan.....	21
7. Pembuatan suspensi biakan.....	21
8. Penimbangan bahan.....	21
9. Peremajaan biakan.....	21
10. Pengamatan uji KHM.....	21
11. Pembuatan larutan uji.....	21
12. Pengujian KHM	21

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Skema Kerja Umum.....	14
2. Skema Kerja Uji KHM	15
3. Perhitungan.....	16
4. Data Hasil Uji KHM.....	19
5. Komposisi Medium	20
6. Dokumentasi Penelitian	21
7. <i>Certificate of Analysis</i>	22

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan penjelasan
μ	mikro
g	gram
M	Molar
mg	miligram
mL	mililiter
AMPK	<i>Adenosin monophosphate kinase</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
FIC	<i>Fractional inhibitory concentration</i>
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i>
FM	Faktor modulasi
KHM	Konsentrasi hambat minimum
KBM	Konsentrasi bunuh minimum
MF	Modulation factor
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TTC	<i>2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride</i>

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang paling banyak menyebabkan infeksi pada manusia terutama pada kulit, jaringan lunak, tulang, dan peredaran darah (Meylina *et al.*, 2024). Menurut studi epidemiologi, angka kejadian infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* mengalami peningkatan secara signifikan dalam dua dekade terakhir secara global dengan prevalensi 18-30% (Khasanah *et al.*, 2024). Di Indonesia, tingkat prevalensi infeksi bakteri ini dilaporkan berada pada kisaran 25–65% dengan rata-rata nasional mencapai 38% (Nanggita *et al.*, 2023). Salah satu pilihan utama untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah penggunaan antibiotik penisilin spektrum luas seperti amoksisilin. Namun, *S. aureus* menjadi masalah yang sangat serius karena peningkatan resistensi bakteri ini terhadap berbagai jenis antibiotik (*Multi Drug Resistance*) salah satunya amoksisilin (Permana & Mazlan, 2024). Pada tahun 2019, dilaporkan sekitar 1,27 juta kematian akibat resistensi terhadap antibiotik, sementara sekitar 4,95 juta kematian lainnya berhubungan dengan infeksi yang tidak lagi responsif terhadap pengobatan antibiotik (WHO, 2023).

Penelitian yang dilakukan oleh Novelni *et al.* (2023) menunjukkan bahwa amoksisilin memiliki tingkat resistensi terhadap *S. aureus* sebesar 67%. Penelitian lainnya juga menunjukkan 74% tingkat resistensi amoksisilin terhadap *S. aureus* (Ezeh *et al.*, 2023). Masalah resistensi ini dapat menyebabkan antibiotik tidak dapat lagi menghambat ataupun membunuh bakteri tersebut sehingga tidak lagi memberikan efek (Kamri *et al.*, 2023).

Salah satu upaya untuk melawan bakteri yang resisten terhadap banyak antibiotik yaitu dengan menggunakan bahan non-antibiotik untuk mempengaruhi aktivitas antibiotik ketika digunakan secara bersamaan yang disebut dengan efek modulasi. Efek modulasi dapat membuat antibiotik yang sudah ada kembali efektif terhadap bakteri yang telah resisten (Mérillon & Riviere, 2018). Aktivitas penghambatan pada suatu bakteri dari kombinasi tersebut dapat ditentukan dari nilai FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Index*), yang menunjukkan bahwa kombinasi antibiotik dan bahan non-antibiotik memiliki efek sinergis, aditif, indifferen atau antagonis (A'iana *et al.*, 2017).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metformin dapat menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme, salah satunya bakteri *S. aureus* karena dapat melemahkan pertahanan bakteri, meningkatkan penetrasi antibiotik, dan menekan resistensi (Liu *et al.*, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Nainu *et al.* (2025) secara *in vivo* menunjukkan bahwa metformin dapat memberikan aktivitas antibakteri yang diujikan pada konsentrasi 1 mM, 5 mM, dan 25 mM. Selain itu, metformin berpotensi untuk memodulasi mikrobiota inang dan menghambat proliferasi bakteri patogen (Nainu *et al.*, 2025).

Penelitian lain dilakukan oleh Masadeh *et al.* (2021) dengan uji *checkerboard* dan konsentrasi MIC metformin 500 µM, menunjukkan bahwa kombinasi metformin dengan berbagai antibiotik seperti doksisisiklin, levofloksasin, ampisilin, kloramfenikol, dan rifampisin dapat menurunkan nilai MIC secara signifikan bahkan hingga lebih dari 90%

pada beberapa kombinasi. Penurunan nilai MIC ini menandakan bahwa dosis antibiotik yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan *S. aureus* dapat ditekan, sehingga efektivitas terapi meningkat dan risiko resistensi dapat berkurang. Selain itu, kombinasi metformin dengan antibiotik terbukti menghasilkan efek sinergis maupun aditif, yang menunjukkan aktivitas antibiotik menjadi lebih kuat dibandingkan jika digunakan secara tunggal. Sehingga, metformin berperan penting sebagai modulator sekaligus adjuvan yang tidak hanya memperkuat potensi antibiotik terhadap *S. aureus*, tetapi juga membantu mengatasi masalah resistensi bakteri (Masadeh *et al.*, 2021).

Hingga saat ini, belum terdapat penelitian mengenai pengaruh antibakteri kombinasi amoksisilin dengan metformin sebagai modulator dan adjuvan terhadap bakteri *S. aureus*. Hal ini yang mendasari perlunya dilakukan penelitian mengenai pengaruh metformin terhadap aktivitas antibakteri amoksisilin pada *S. aureus* secara *in vitro*.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah penambahan metformin dapat memodulasi aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap *S. aureus*?
2. Bagaimana interaksi kombinasi antara amoksisilin dengan metformin terhadap pertumbuhan *S. aureus*?

I.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui apakah penambahan metformin dapat memodulasi aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap *S. aureus*.
2. Untuk mengetahui interaksi kombinasi antara amoksisilin dengan metformin terhadap pertumbuhan *S. aureus*.

BAB II

METODE KERJA

II.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microplate* 96 wells (Biologix®), mikropipet (Memmert®), inkubator (Memmert®), McFarland densitometer (Biosan®), autoklaf (All American Model 25X-2®), oven (Ecocell®), kompor listrik (Oxone®), *biosafety cabinet* (Thermo®), timbangan analitik (Ohaus®), *vortex mixer* (Gemmy VM-300®), spoit (OneMed®), dan alat-alat gelas.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk amoksisilin diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, serbuk metformin (Wellnature®), biakan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, reagen 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida (TTC) 1% (Himedia®), medium *Mueller-Hinton Broth* (Himedia®), medium *Tryptic Soy Agar* (Merck®), tip, *aquadest* (Waterone™), dan larutan NaCl 0,9% (Otsu®).

II.2 Metode Kerja

II.2.1 Sterilisasi alat

Alat-alat gelas tanpa skala dan berbahan logam disterilisasi menggunakan oven pada suhu 170°C selama satu jam. Sementara itu, gelas ukur, serta alat yang terbuat dari plastik dan karet, disterilisasi memakai autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Wulandari *et al.*, 2021).

II.2.2 Pembuatan medium

Medium *Tryptic Soy Agar* (TSA) sebanyak 2,4 gram dilarutkan dalam 60 mL *aquadest* dengan bantuan pemanasan. Kemudian, medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Arfiandi & Tumbol, 2020).

Medium *Mueller-Hinton Broth* (MHB) ditimbang sejumlah 1,05 gram lalu dilarutkan ke dalam 50 mL *aquadest*. Larutan tersebut disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Permana & Mazlan, 2024).

II.2.3 Penyiapan bakteri uji

Peremajaan isolat bakteri *S. aureus* dilakukan dengan menggunakan medium TSA dengan cara diambil satu ose biakan, kemudian digores pada agar miring. Setelah itu, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pembuatan suspensi biakan dilakukan dengan cara kultur bakteri *S. aureus* disuspensikan dalam 10 mL NaCl 0,9% steril hingga kekeruhannya sesuai dengan standar 0,5 McFarland (densitas biakan setara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Kemudian, sebanyak 0,1 mL suspensi biakan dimasukkan ke dalam 9,9 mL media MHB sehingga jumlah bakteri menjadi $1,5 \times 10^6$ CFU/mL (Husain *et al.*, 2022).

II.2.4 Pembuatan larutan uji amoksisilin

Amoksisilin ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan 10 mL air steril sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. Selanjutnya, diencerkan kembali hingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL. Setelah itu, dilakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi larutan stok sebesar 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, dan 0,625 µg/mL.

II.2.5 Pembuatan larutan uji metformin

Metformin ditimbang sebanyak 0,1656 gram, kemudian dilarutkan dengan 10 mL air steril sehingga diperoleh konsentrasi 100 mM/mL. Selanjutnya, diencerkan menjadi 50 mM/mL dan diencerkan kembali hingga diperoleh konsentrasi 25 mM/mL. Setelah itu, dilakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi larutan stok 10000 µM/mL, 5000 µM/mL, 2500 µM/mL, 1250 µM/mL, 625 µM/mL, dan 312,5 µM/mL.

II.2.6 Penentuan konsentrasi hambat minimum amoksisilin

Konsentrasi hambat minimum (KHM) amoksisilin ditentukan dengan menggunakan metode *microdilution checkerboard assay* pada *microplate* 96 wells dengan volume total tiap sumuran adalah 200 µL. Setiap sumuran diisi dengan media MHB dengan variasi volume untuk masing-masing perlakuan, meliputi: (a) sampel (160 µL media), (b) kontrol pelarut (160 µL media), (c) kontrol biakan dan kontrol sampel (180 µL media), dan (d) kontrol media (200 µL media).

Sebanyak 20 µL dari tiap-tiap larutan stok uji amoksisilin dimasukkan ke dalam sumuran (konsentrasi akhir dalam sumuran sebesar: 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, dan 0,0625 µg/mL). Kemudian, sebanyak 20 µL suspensi bakteri uji *S. aureus* ditambahkan ke sumuran berisi sampel, kontrol pelarut, dan kontrol biakan.

Microplate diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, tiap sumuran ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 10 µL lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Perubahan warna pada sumuran diamati secara visual; pembentukan warna merah muda menunjukkan adanya bakteri hidup. Konsentrasi terendah sampel yang menunjukkan tidak terjadinya perubahan warna adalah nilai KHM.

II.2.7 Penentuan konsentrasi hambat minimum metformin

Konsentrasi hambat minimum metformin ditentukan dengan menggunakan metode *microdilution checkerboard assay* pada *microplate* 96 wells dengan skema yang sama dengan pengujian KHM amoksisilin tunggal. Konsentrasi akhir metformin di dalam sumuran adalah 500 µM/mL, 250 µM/mL, 125 µM/mL, 62,5 µM/mL, dan 31,25 µM/mL.

II.2.8 Penentuan konsentrasi hambat minimum kombinasi amoksisilin dan metformin

Pengujian KHM kombinasi amoksisilin dan metformin juga ditentukan. Kombinasi amoksisilin dan metformin ditentukan dengan menggunakan metode *microdilution checkerboard assay* pada *microplate* 96 wells. Skema pengujian yang dilakukan

menyerupai skema pada pengujian KHM senyawa tunggal, namun dilakukan modifikasi pada volume sampel yang ditambahkan, meliputi: (a) 10 μL larutan stok amoksisilin untuk tiap-tiap konsentrasi larutan stok (konsentrasi akhir dalam sumuran sebesar 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,125 $\mu\text{g/mL}$, dan 0,0625 $\mu\text{g/mL}$), dan (b) 10 μL larutan stok metformin untuk tiap-tiap konsentrasi larutan stok (konsentrasi akhir dalam sumuran sebesar 500 $\mu\text{M/mL}$, 250 $\mu\text{M/mL}$, 125 $\mu\text{M/mL}$, 62,5 $\mu\text{M/mL}$, dan 31,25 $\mu\text{M/mL}$).

Microplate diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, tiap sumuran ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 10 μL lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Perubahan warna pada sumuran diamati secara visual; pembentukan warna merah muda menunjukkan adanya bakteri hidup. Konsentrasi terendah sampel yang menunjukkan tidak terjadinya perubahan warna adalah nilai KHM. Ilustrasi skema pengujian menggunakan metode *microdilution checkerboard assay* pada *microplate* 96 wells dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

II.2.9 Penentuan nilai faktor modulasi (FM)

Faktor modulasi merupakan perbandingan yang digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa dapat meningkatkan atau menurunkan kerja antibiotik ketika digunakan pada konsentrasi subinhibitor, yaitu konsentrasi yang lebih rendah dari konsentrasi penghambat pertumbuhan bakteri. Semakin besar nilai FM, maka semakin kuat kemampuan senyawa tersebut dalam meningkatkan efektivitas antibiotik. Suatu senyawa dianggap dapat memodulasi apabila nilainya ≥ 4 . Penentuan nilai faktor modulasi kombinasi antara amoksisilin dan metformin secara matematis adalah sebagai berikut (Mérillon & Riviere, 2018; Rahman & Choudhary, 2018):

$$\text{FM} = \frac{\text{KHM amoksisilin tunggal}}{\text{KHM kombinasi amoksisilin-metformin}} \quad (1)$$

II.2.10 Penentuan nilai konsentrasi fraksional (Fractional Inhibitory Concentration Indeks/FICI) kombinasi amoksisilin dan metformin

Konsentrasi hambat fraksional merupakan indeks yang digunakan untuk mengetahui kemampuan aktivitas penghambatan bakteri dari kombinasi dua antibiotik atau bahan non-antibiotik (A'iana *et al.*, 2017). Penentuan nilai konsentrasi hambat fraksional (*Fractional Inhibitory Concentration Index*/FICI) kombinasi antara amoksisilin dan metformin secara matematis adalah sebagai berikut (Prasetyo *et al.*, 2022):

$$\text{FIC}_1 \text{ (amoksisilin)} = \frac{\text{KHM kombinasi amoksisilin-metformin}}{\text{KHM amoksisilin tunggal}} \quad (2)$$

$$\text{FIC}_2 \text{ (metformin)} = \frac{\text{KHM kombinasi metformin-amoksisilin}}{\text{KHM metformin tunggal}} \quad (3)$$

$$\text{FICI} = \text{FIC}_1 + \text{FIC}_2 \quad (4)$$

Interaksi secara *in vitro* antara agen antibakteri dapat ditentukan dengan rumus tersebut, efeknya dapat dituliskan sebagai berikut:

Sinergis : nilai FICI $\leq 0,5$

Aditif : nilai FICI $> 0,5$ atau ≤ 1

Indiferen : nilai FICI > 1 atau ≤ 4

Antagonis : nilai FICI > 4

II.3 Analisis data

Data hasil penelitian akan dianalisis dan dibahas untuk kemudian dapat ditarik kesimpulan.