



**EFEK KOMBINASI ERITROMISIN DAN N-ASETILSISTEIN  
TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus pneumoniae*  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Oleh

**Intan Palupi  
NIM 122010101056**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**EFEK KOMBINASI ERITROMISIN DAN N-ASETILSISTEIN  
TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus pneumoniae*  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

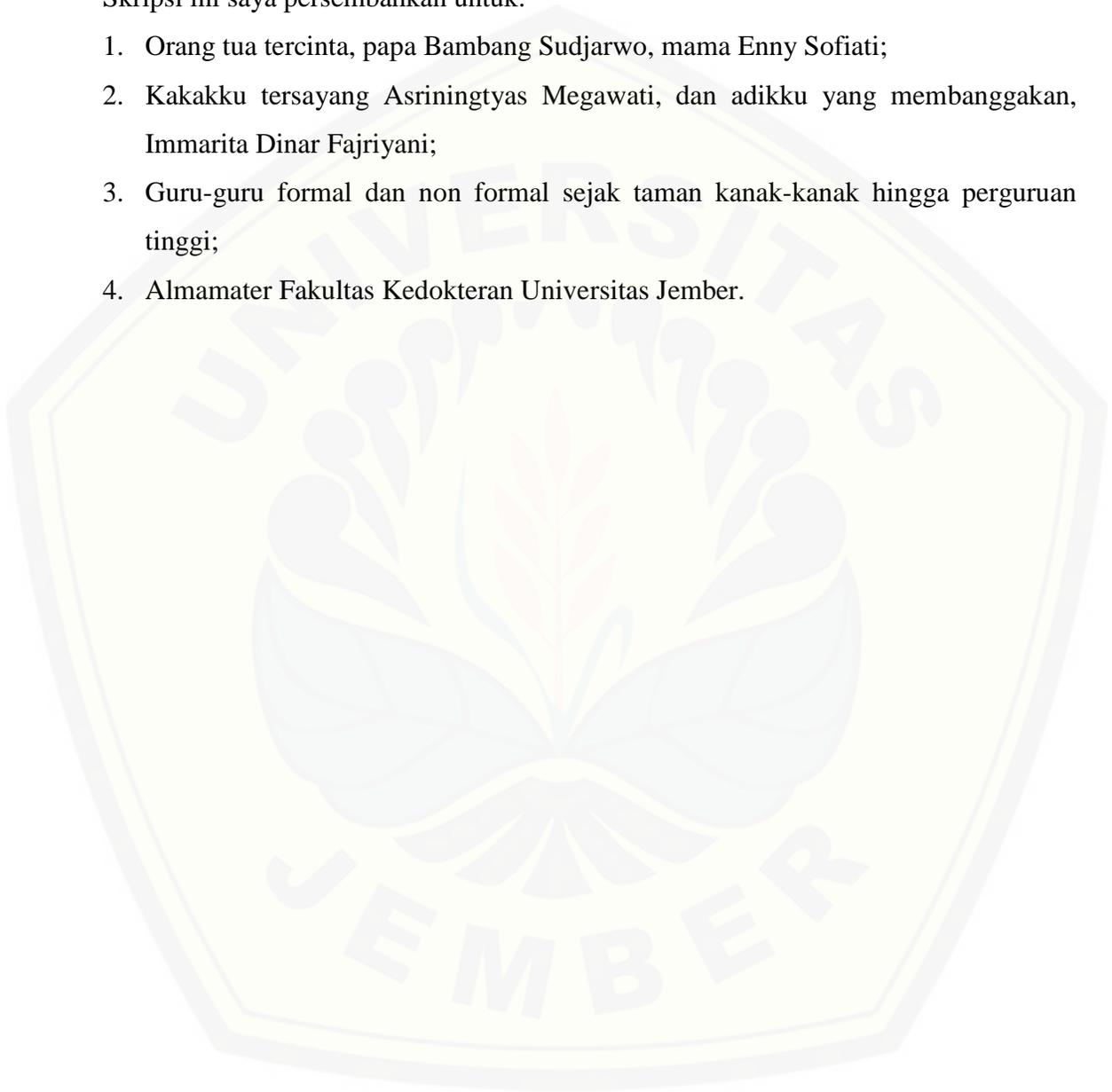
**Intan Palupi**  
**NIM 122010101056**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua tercinta, papa Bambang Sudjarwo, mama Enny Sofiati;
2. Kakakku tersayang Asriningtyas Megawati, dan adikku yang membanggakan, Immarita Dinar Fajriyani;
3. Guru-guru formal dan non formal sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



**MOTO**

“Sesungguhnya, Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri. Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap suatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya dan tidak ada pelindung bagi mereka selain Dia”  
(Terjemahan Q.S Ar Ra’d [13]:11)\*)

“Maka bersabarlah kamu dengan sabar yang baik.”  
(Terjemahan Q.S Al-Ma’arij [70]: 5\*\*)

---

\*) \*\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al Qur’an dan Terjemahannya. Bandung: PT Sygma

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Intan Palupi

NIM : 122010101056

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Desember 2015

Yang menyatakan,

Intan Palupi

NIM 122010101056

**SKRIPSI**

**EFEK KOMBINASI ERITROMISIN DAN N-ASETILSISTEIN  
TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus pneumoniae*  
SECARA *IN VITRO***

Oleh

Intan Palupi

NIM 122010101056

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : dr. Dini Agustina, M.Biomed.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Ulfa Elfiah, M.Kes., Sp. BP-RE.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *In Vitro*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 22 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,

dr. Cicih Komariah Sp.M.  
NIP 19740928 200501 2 001

dr. Yudha Nurdian, M.Kes.  
NIP 19711019 199903 1 001

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Dini Agustina, M.Biomed.  
NIP 19830801 200812 2 003

dr. Ulfa Elfiah, M.Kes., Sp.BP-RE.  
NIP 19760719 200112 2 001

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Enny Suswati, M.Kes.  
NIP 19700214 199903 2 001

## RINGKASAN

**Efek Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *In Vitro***; Intan Palupi , 122010101056; 2015: 53 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Pneumonia merupakan penyakit infeksi saluran pernafasan yang morbiditasnya masih tinggi di Indonesia. Etiologi pneumonia yang paling sering adalah akibat infeksi bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Penatalaksanaan pneumonia akibat infeksi bakteri adalah dengan pemberian antibiotik. Salah satu antibiotik yang menjadi *drug of choice* pneumonia adalah eritromisin. Tidak jarang pemberian antibiotik dikombinasikan dengan terapi simptomatis berupa N-asetilsistein, suatu agen mukolitik dan antioksidan. Telah ada beberapa penelitian terdahulu yang meneliti tentang penggunaan kombinasi antibiotik dan antioksidan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil penelitian tersebut ada yang mengatakan N-asetilsistein meningkatkan aktivitas antibakteri antibiotik dan ada pula yang menurunkan aktivitas antibakteri antibiotik terhadap bakteri patogen. Pro dan kontra inilah yang mendasari penelitian ini. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein terhadap pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro* dan menentukan konsentrasi terkecil dari N-asetilsistein dalam kombinasinya dengan eritromisin yang mampu menurunkan aktivitas antibakteri antibiotik eritromisin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae*

Penelitian ini merupakan jenis penelitian quasi eksperimental dengan satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan lima kelompok perlakuan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ. Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah sekitar 1,5 bulan. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

Dilakukan penelitian berupa uji sensitivitas kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein menggunakan metode *disk diffusion*. Larutan kombinasi/campuran obat diteteskan pada cakram kertas dan terbagi dalam 7 kelompok. Kelompok kontrol positif adalah cakram kertas yang hanya berisi eritromisin 15 $\mu$ g/5 $\mu$ l, kelompok kontrol negatif berisi aquades, dan kelompok perlakuan diberi kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein dengan konsentrasi N-asetilsistein yang bertingkat yaitu 1,25 mg/ml; 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10mg/ml dan 20mg/ml. Selanjutnya dilakukan penempelan cakram kertas pada media MHA (Muller Hinton Agar) yang disuplementasi 5% darah domba dan telah diinokulasi bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Indikator penghambatan pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* terlihat dari zona bening atau zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas yang diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Hasil menunjukkan bahwa diameter zona hambat terbesar dibentuk oleh kelompok kontrol positif dengan rata-rata 30,36 mm. Sedangkan pada kelompok perlakuan yaitu pemberian kombinasi obat, menunjukkan diameter zona hambat yang semakin mengecil sesuai dengan peningkatan konsentrasi N-asetilsistein dalam kombinasi.

Data berupa diameter zona hambat di uji normalitasnya dengan uji *Saphiro Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), dilanjutkan dengan uji korelasi *Pearson* dengan nilai sig 0,000 yang menunjukkan korelasi bermakna ( $p < 0,01$ ). Nilai korelasi *Pearson* sebesar -0.918 menunjukkan korelasi negatif atau hubungan yang berlawanan dengan kekuatan korelasi yang sangat kuat. Dari analisis regresi logaritmik diketahui konsentrasi terkecil N-asetilsistein dalam kombinasi yang mampu menurunkan aktivitas antibakteri eritromisin dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* sebesar 1,66 mg/ml.

Penelitian *in vitro* membuktikan bahwa N-asetilsistein dalam kombinasi dengan eritromisin dapat menurunkan aktivitas antibakteri eritromisin dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumo*

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Dini Agustina, M.Biomed. dan dr. Ulfa Elfiah, M.Kes., Sp.BP-RE. selaku dosen pembimbing utama dan anggota yang telah meluangkan waktu, serta memberikan ilmu, tenaga dan dukungan untuk membimbing dan memotivasi saya dalam melakukan penelitian dan menyusun skripsi ini sebaik-baiknya;
3. dr. Cicih Komariah, Sp.M. dan dr. Yudha Nurdian, M.Kes. sebagai dosen penguji yang berkenan memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes., yang telah memberikan banyak bantuan dan masukan dalam penelitian ini;
5. Orang tua tercinta, papa Drs. Bambang Sudjarwo, M.M. dan mama Dra. Enny Sofiati, kakak drg. Asriningtyas Megawati, adik Immarita Dinar Fajriyani dan kakak ipar, Zaldin Abdi Maulana, S.H., M.Kn. yang selalu mendoakan, mendukung dan memberikan semangat hingga aku dapat menyelesaikan pendidikan tinggi ini;
6. Sahabat sekaligus rekan kerja terbaikku, Kardiana Izza Ell Milla, Bagus Dwi Kurniawan dan Farmitalia Nisa Trisianti atas segala kerja sama, bantuan,

semangat, dorongan dan motivasi yang selalu diberikan dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;

7. Sahabat-sahabat terbaikku, Chandra Puspita K.S.P., Anggita dan Niki Rahmawati yang selalu memberikan semangat, dukungan dan bantuan yang luar biasa dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
8. Sahabat terdekatku, Atika Rosada yang sejak sekolah menengah atas selalu memberikan semangat dan dukungan dalam menempuh cita-cita kita bersama ini;
9. Teman-teman dekatku Yessie Elin Santoso, Edda Rachmadenawanti, Sarah Andriani, Balqis Fildzah Badzlina, Laily Rahmawati, dan Monica Bethari Primanesa yang selalu memberikan motivasi dan masukan yang positif dalam mengerjakan skripsi ini;
10. Analis Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Lilis Lestari, A.Md., yang telah banyak membantu dalam penelitian ini, dan selalu memberikan semangat dalam menyusun skripsi ini;
11. Analis Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Ahmad Kodri Riyandoko, A.Md.Kep. dan Laksono Hadi Prasetyo, A.Md.Kep. yang telah membantu dalam penelitian ini;
12. Keluarga angkatan 2012 (Panacea) yang selalu memberikan dukungan selama ini;
13. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 22 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN BIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	4
<b>1.3 Tujuan</b> .....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
<b>1.4 Manfaat</b> .....	5
1.4.1 Manfaat Teoritis .....	5
1.4.2 Manfaat Aplikatif .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
<b>2.1 Eritromisin</b> .....	6
2.1.1 Pengertian.....	6
2.1.2 Farmakokinetik dan Farmakodinamik.....	7

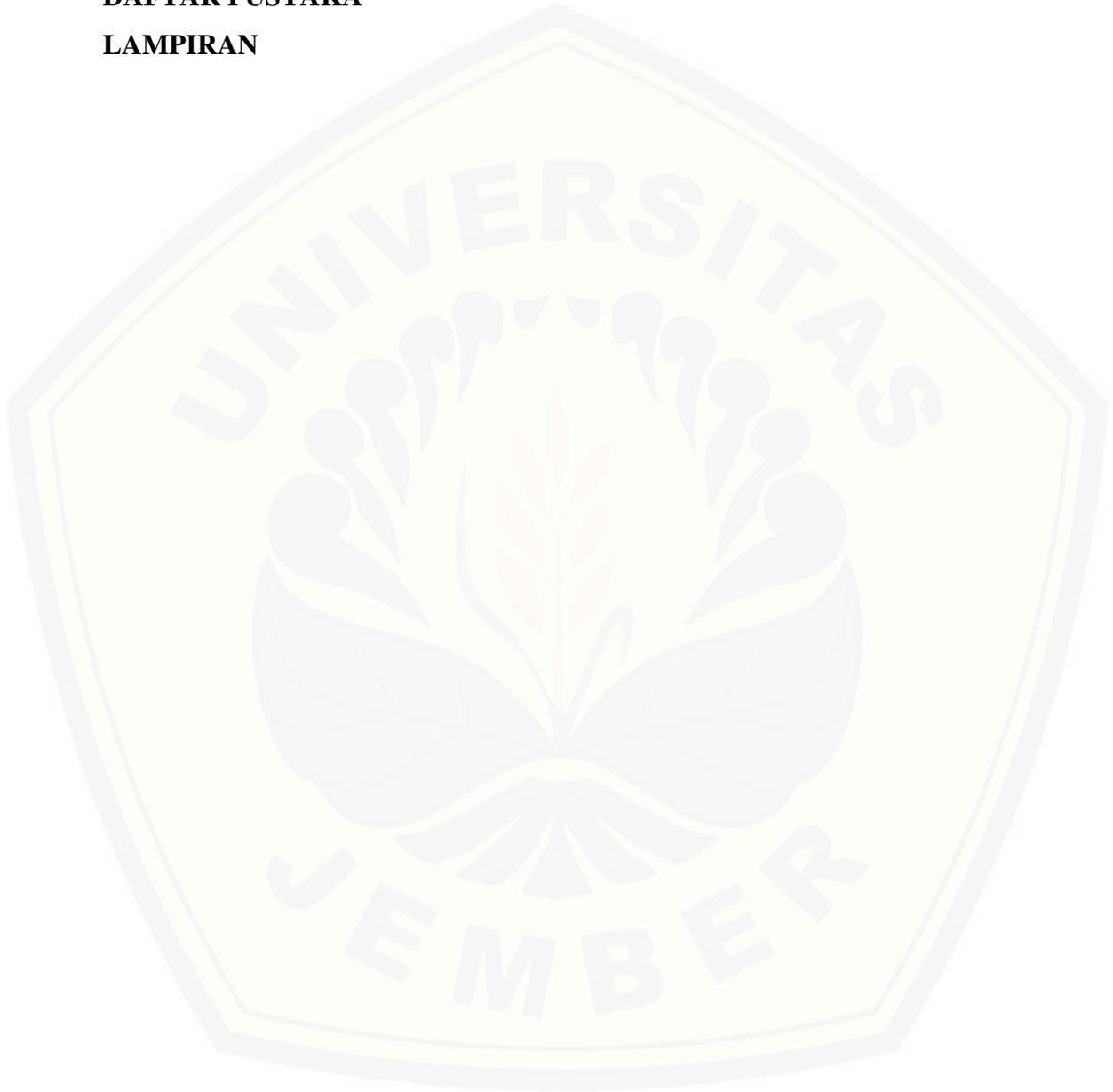
2.1.3 Dosis dan Penggunaan.....	8
<b>2.2 N-asetilsistein .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Pengertian.....	9
2.2.2 Farmakokinetik dan Farmakodinamik .....	9
2.2.3 Kombinasi Antibiotik dan N-asetilsistein .....	10
2.2.4 Interaksi Obat Eritromisin dan N-asetilsistein .....	12
<b>2.3 <i>Streptococcus pneumonia</i> .....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Morfologi Bakteri .....	13
2.3.2 Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan.....	14
2.3.3 Infeksi akibat <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
2.3.4 Glutathion Alami pada <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	17
<b>2.4 Kerangka Teori .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Kerangka Konsep.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Hipotesis Penelitian .....</b>	<b>21</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Sampel Penelitian.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Variabel Penelitian.....</b>	<b>24</b>
3.5.1 Variabel Bebas.....	24
3.5.2 Variabel Terikat.....	25
3.5.3 Variabel Kendali.....	25
<b>3.6 Definisi Operasional .....</b>	<b>25</b>
3.6.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	25
3.6.2 Pertumbuhan Bakteri.....	25
3.6.3 Eritromisin.....	25
3.6.4 N-asetilsistein.....	26
3.6.5 Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein.....	26

3.6.6 Uji Sensitivitas.....	26
3.6.7 Diameter Zona Hambat.....	27
3.6.8 Pengukuran Diameter Zona Hambat.....	27
3.6.9 Interpretasi Efek Kombinasi.....	28
<b>3.7 Alat dan Bahan</b> .....	29
3.7.1 Alat.....	29
3.7.2 Bahan.....	29
<b>3.8 Prosedur Kerja</b> .....	29
3.8.1 Persiapan Alat.....	29
3.8.2 Pembuatan Media BAP ( <i>Blood Agar Plate</i> ) dan Peremajaan Bakteri.....	29
3.8.3 Pembuatan MHA (Muller Hinton Agar) yang Disuplementasi dengan 5% Darah Domba.....	30
3.8.4 Pembuatan <i>Stock Solution</i> Eritromisin dan N-asetilsistein .....	30
3.8.5 Pembuatan Suspensi Bakteri.....	31
3.8.6 Inokulasi bakteri pada MHA (Muller Hinton Agar) dengan Suplementasi 5% Darah Domba.....	31
3.8.7 Uji Sensitivitas Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein ....	32
<b>3.9 Parameter yang Diukur</b> .....	32
<b>3.10 Interpretasi Efek Kombinasi</b> .....	32
<b>3.11 Analisis Data</b> .....	33
<b>3.12 Alur Penelitian</b> .....	34
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	35
<b>4.1 Hasil Penelitian</b> .....	35
4.1.1 Tempat, Waktu dan Sampel Penelitian.....	35
4.1.2 Hasil Uji Sensitivitas .....	35
<b>4.2 Analisis Data</b> .....	39
<b>4.3 Pembahasan</b> .....	42
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	47

<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	47
<b>5.2 Saran</b> .....	47

**DAFTAR PUSTAKA**

**LAMPIRAN**

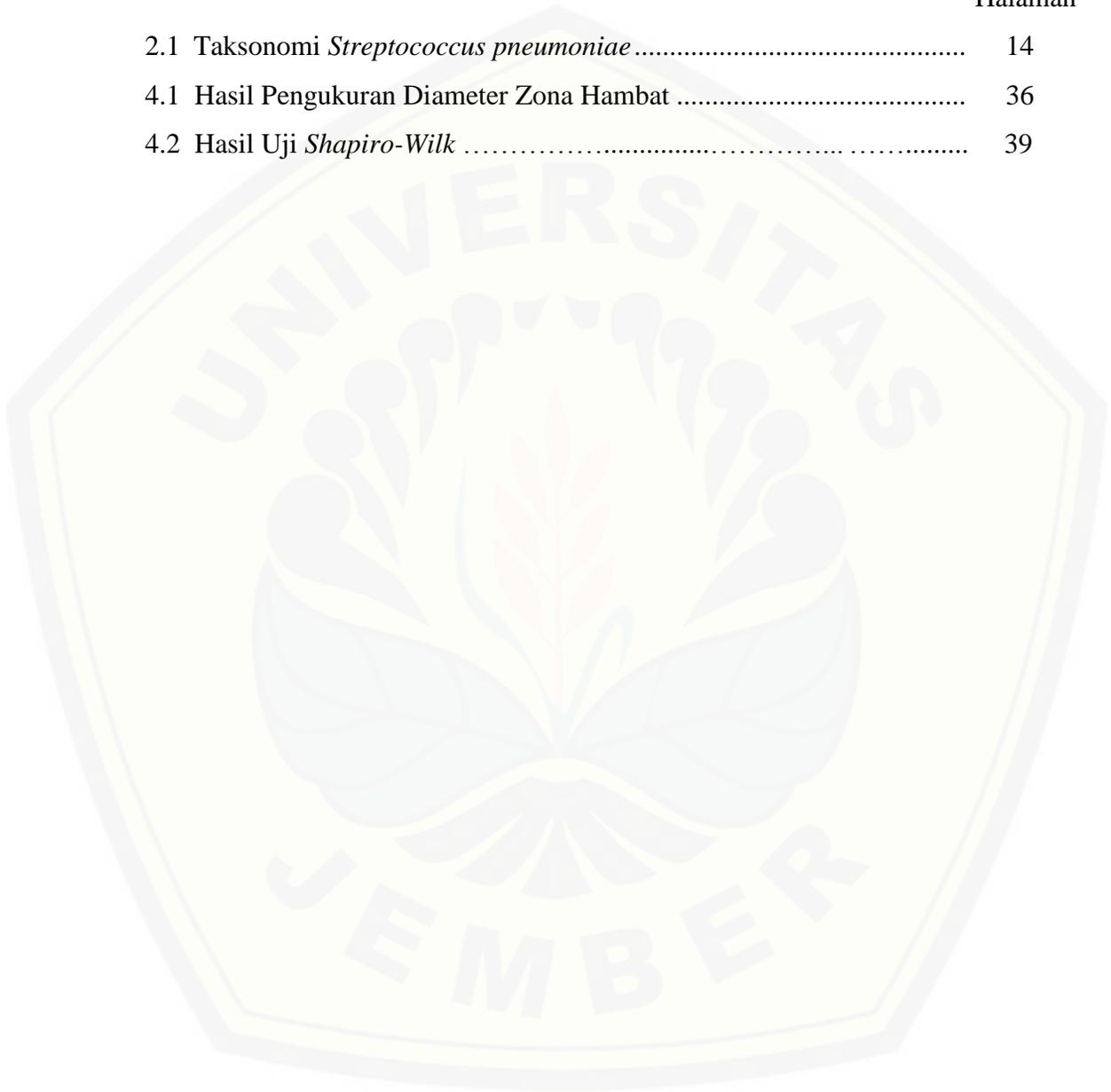


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur kimia eritromisin ( $C_{37}H_{67}NO_{13}$ ).....	6
2.2 Mekanisme aksi makrolid .....	7
2.3 Struktur kimia N-asetilsistein .....	9
2.4 Morfologi <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	14
2.5 Koloni <i>S. pneumoniae</i> pada <i>blood agar</i> .....	14
2.6 Kerangka Teori.....	18
2.7 Kerangka Konsep .....	20
3.1 Rancangan Penelitian.....	23
3.2 Alur Penelitian .....	27
3.3 Zona Hambat pada MHA yang Disuplementasi dengan 5% Darah Domba .....	28
3.4 Cara pengukuran Diameter Zona Hambat menggunakan Jangka Sorong.....	34
4.1 Zona Hambat Hasil Uji Sensitivitas .....	38
4.2 Diagram Batang Rata-rata Diameter Zona Hambat .....	39
4.3 Grafik Persamaan Regresi Logaritmik.....	42

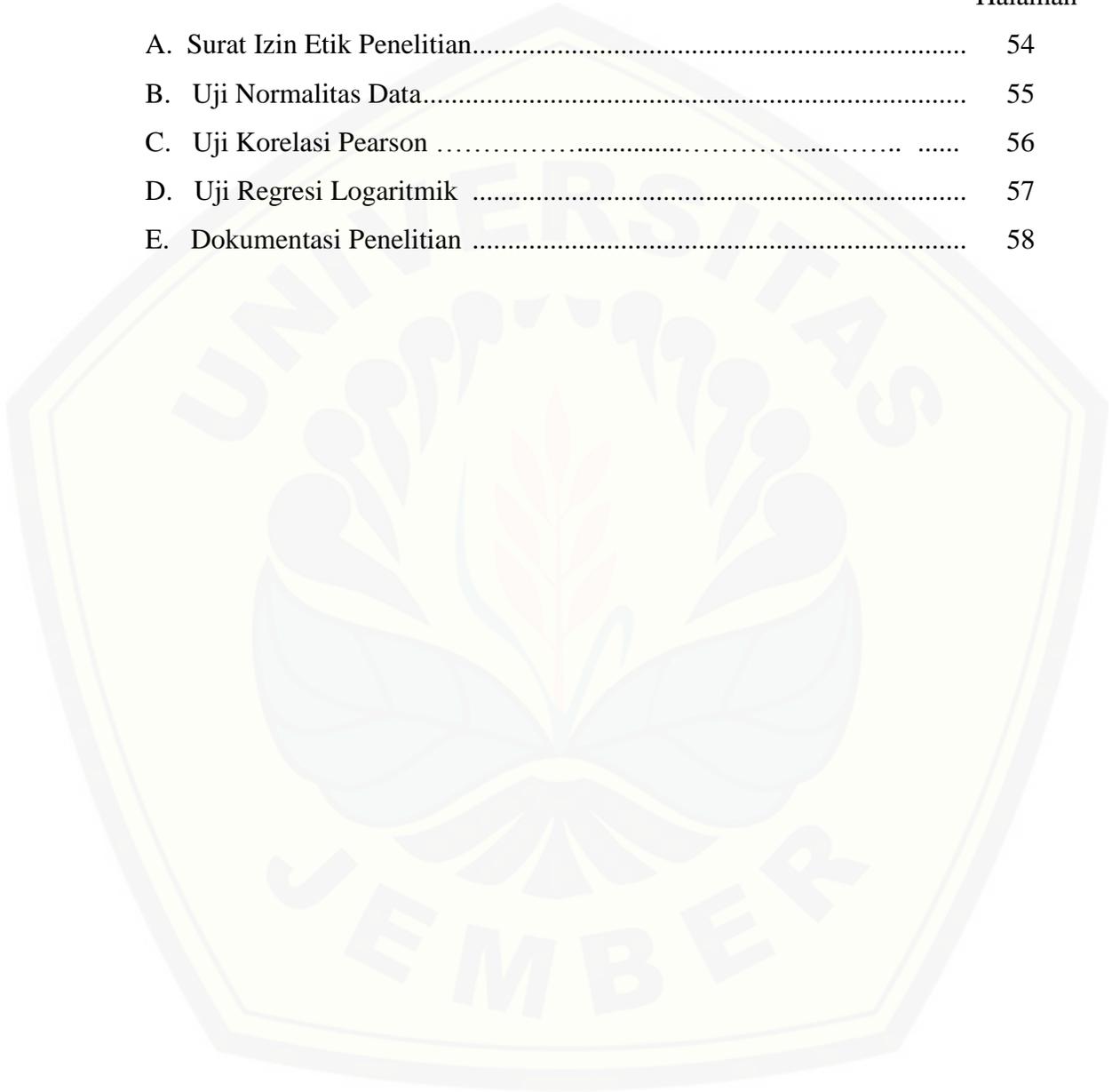
**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Taksonomi <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	14
4.1 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat .....	36
4.2 Hasil Uji <i>Shapiro-Wilk</i> .....	39



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Surat Izin Etik Penelitian.....	54
B. Uji Normalitas Data.....	55
C. Uji Korelasi Pearson .....	56
D. Uji Regresi Logaritmik .....	57
E. Dokumentasi Penelitian .....	58



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi masih menjadi masalah kesehatan utama di Indonesia. Salah satu penyakit infeksi yang masih sering terjadi adalah pneumonia. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013, prevalensi pneumonia di Indonesia sekitar 4,5%. Hasil pencatatan dan pelaporan Dinkes Provinsi Jawa Timur pada tahun 2012, kejadian pneumonia di Jawa Timur sebesar 27,08%, atau dengan jumlah penderita 84.392 orang (Dinkes Jatim, 2013).

Pneumonia adalah peradangan yang mengenai parenkim paru, distal dari bronkiolus terminalis yang mencakup bronkiolus respiratorius dan alveoli serta menimbulkan konsolidasi jaringan paru dan gangguan pertukaran gas setempat (Sudoyo *et al.*, 2009). Data WHO dan UNICEF menunjukkan bahwa 50% penyebab utama penyakit pneumonia adalah bakteri *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), 20% disebabkan oleh *Haemophilus influenzae* tipe B, dan 30% disebabkan oleh virus (WHO, 2006). Selain itu, pneumonia menjadi penyebab kematian tertinggi pada anak-anak di Indonesia, dan penyebab kematian nomor 6 pada orang dewasa (Farida, 2015).

Penanganan pneumonia yang utama adalah dengan pemberian antibiotik. Berdasarkan *American Thoracic Society*, rekomendasi kuat untuk penatalaksanaan pneumonia secara empiris adalah menggunakan antibiotik golongan makrolid (Mandell *et al.*, 2007). Makrolid dipilih karena telah banyak berkembang *strain* bakteri yang resisten terhadap antibiotik golongan penicillin. Salah satu antibiotik golongan makrolid adalah eritromisin. Eritromisin sensitif terhadap bakteri gram positif termasuk *S. pneumoniae* dan bekerja dengan cara menghambat sintesis protein bakteri pada ribosom subunit 50S (Katzung *et al.*, 2014).

Selain terapi kausatif pneumonia menggunakan antibiotik, ada pula terapi simptomatis yang diberikan secara bersamaan dengan terapi kausatif. Salah satu terapi simptomatis untuk meringankan gejala batuk pada pneumonia adalah dengan menggunakan obat N-asetilsistein. N-asetilsistein bekerja sebagai agen mukolitik yang dapat memutuskan rantai disulfid pada mukoprotein sehingga mukus menjadi lebih encer (Domenech *et al.*, 2012).

Sampai saat ini terdapat beberapa penelitian yang menyatakan penambahan N-asetilsistein pada antibiotik akan membantu kerja antibiotik dalam mengeradikasi bakteri. Hal ini berkaitan dengan sifat N-asetilsistein yang telah diteliti memiliki efek antibiofilm dan antiadheren (Mansouri *et al.*, 2006). Biofilm yang dibentuk oleh bakteri menyebabkan menurunnya jumlah bakteri yang harusnya bisa dieradikasi oleh antibiotik (Lewis, 2008), dan bakteri mampu menghindar dari pertahanan imun tubuh (Jensen *et al.*, 2010). N-asetilsistein dapat mencegah pembentukan biofilm pada bakteri meskipun tidak tergolong sebagai antibiotik. Penelitian yang dilakukan oleh Domenech *et al* pada tahun 2012 membuktikan bahwa N-asetilsistein dapat menghambat pembentukan biofilm oleh *non-encapsulated S. pneumonia strain*, dan secara parsial merusak biofilm yang sebelumnya telah terbentuk (Domenech *et al.*, 2012). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Abbas tahun 2012 menghasilkan kesimpulan bahwa kombinasi N-asetilsistein dengan antibiotik golongan beta-lactam, tetrasiklin, kloramfenikol dan gentamisin ternyata meningkatkan aktivitas antibakteri antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan menurunnya *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (Abbas, 2012).

Selain penelitian yang menyebutkan bahwa kombinasi antibiotik dan N-asetilsistein berefek positif (meningkatkan aktivitas antibakteri antibiotik), ada pula penelitian yang menyebutkan bahwa kombinasi antibiotik dan N-asetilsistein justru menurunkan aktivitas antibakteri antibiotik dalam menghambat bakteri (Goswami dan Jawali, 2010). N-asetilsistein merupakan agen antioksidan, yaitu prekursor dari sistein dan glutathion intraseluler (Santus *et al.*, 2014). Bakteri gram positif termasuk *S. pneumoniae* dikenal memiliki glutathion intraseluler. Glutathion inilah yang berperan

untuk melindungi bakteri dari lingkungan yang asam, dan kondisi stres oksidatif. Selain itu, bila jumlah glutation intrasel mencukupi, bakteri akan dapat melakukan sintesis protein secara maksimal. Adanya N-asetilsistein pada muller hinton agar yang telah ditumbuhi bakteri, kemungkinan akan meningkatkan glutation pada bakteri sehingga pertahanan bakteri lebih kuat dan sintesis protein terus berjalan (Masip *et al.*, 2006).

Penelitian selanjutnya yang dilakukan secara *in vivo* menghasilkan kesimpulan bahwa penambahan antioksidan dapat meningkatkan bakterial peritonitis pada mencit. Antioksidan inilah yang akan mengganggu kerja antibiotik dalam mengeradikasi bakteri penyebab dengan cara menghambat fagositosis terhadap bakteri (Goswami dan Jawali, 2014).

Pro dan kontra terhadap efek kombinasi antibiotik dan N-asetilsistein dalam menghambat pertumbuhan bakteri inilah yang menjadi masalah bagi peneliti. Penelitian ini juga dilatarbelakangi oleh fakta penggunaan N-asetilsistein sebagai terapi simptomatis batuk pada pneumonia, yang diberikan bersamaan dengan antibiotik eritromisin. Fakta ini didukung oleh data dari salah satu rumah sakit di Banyuwangi mengenai persepan N-asetilsistein dan antibiotik. Pada bulan Juli 2015 ada sekitar 100 pasien yang diberikan resep antibiotik dan N-asetilsistein, sedangkan pada bulan Agustus 2015 ada sekitar 50 pasien yang diberikan resep antibiotik dan N-asetilsistein. Antibiotik yang digunakan tersebut mayoritas adalah ciprofloxacin dan eritromisin.

Data penggunaan N-asetilsistein dan antibiotik tersebut menunjukkan cukup seringnya terapi kombinasi diresepkan. Padahal, berdasarkan hasil penelitian diatas, penggunaan terapi kombinasi tersebut masih mungkin bisa berefek negatif terhadap hasil terapi antibiotik (Goswami dan Jawali, 2014). Oleh karena itu, peneliti bermaksud untuk melakukan penelitian tentang efek kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein terhadap pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, dapat dirumuskan permasalahan antara lain.

- a. Bagaimana efek kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein terhadap pertumbuhan *Streptococcus pneumonia* secara *in vitro*?
- b. Bagaimana hasil uji sensitivitas kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*?
- c. Berapakah konsentrasi minimal N-asetilsistein dalam kombinasinya dengan eritromisin yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri eritromisin dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae*?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein terhadap pertumbuhan *Streptococcus pneumonia* secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui hasil uji sensitivitas kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*.
- b. Untuk mengetahui konsentrasi minimal N-asetilsistein dalam kombinasinya dengan eritromisin yang mampu mempengaruhi aktivitas antibakteri eritromisin dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*.

## 1.4 Manfaat

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai efek kombinasi N-asetilsistein dan antibiotik eritromisin terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumonia* secara *in vitro*.

### 1.4.2 Manfaat Aplikatif

- a. Memberikan data dan informasi baru pada klinisi mengenai efek kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein sebagai pertimbangan pemberian terapi farmakologis pada penyakit infeksi saluran pernapasan, terutama penyakit pneumonia.
- b. Membantu memberikan jawaban atas pro dan kontra penggunaan N-asetilsistein bersamaan dengan terapi antibiotik.

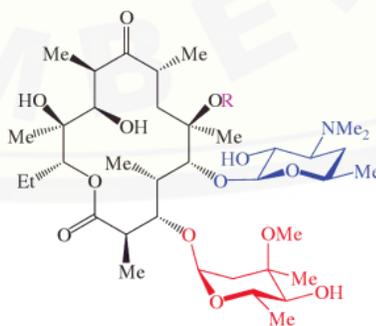
## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Eritromisin

#### 2.1.1 Pengertian

Eritromisin merupakan antibiotik yang aktif secara oral, yang ditemukan oleh McGuire pada tahun 1952 dalam produk metabolisme *Streptomyces erythraeus*. Eritromisin termasuk dalam golongan antibiotik makrolida. Antibiotik makrolida merupakan suatu golongan obat anti mikroba yang menghambat sintesis protein mikroba (Katzung *et al.*, 2014).

Makrolid adalah suatu golongan senyawa yang berkaitan erat dan ditandai oleh sebuah cincin lakton makrosiklik (biasanya mengandung 14 atau 16 atom), tempat gula-gula deoksi melekat. Salah satu jenis makrolid yaitu eritromisin, terdiri dari dua gugus gula yang melekat ke sebuah cincin lakton 14 atom. Klaritromisin dan azitromisin adalah turunan semisintetik eritromisin. Struktur umum eritromisin diperlihatkan dengan cincin makrolid dan gula desosamin dan kladinosa. Obat ini kurang larut dalam air (0,1%), tetapi mudah larut dalam pelarut organik. Larutan relatif stabil pada suhu 20<sup>0</sup>C dan pada pH asam. Eritromisin biasanya dibuat dalam bentuk ester dan garam (Katzung *et al.*, 2014). Eritromisin dengan rumus molekul C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>13</sub> memiliki rumus bangun seperti pada Gambar 2.1.



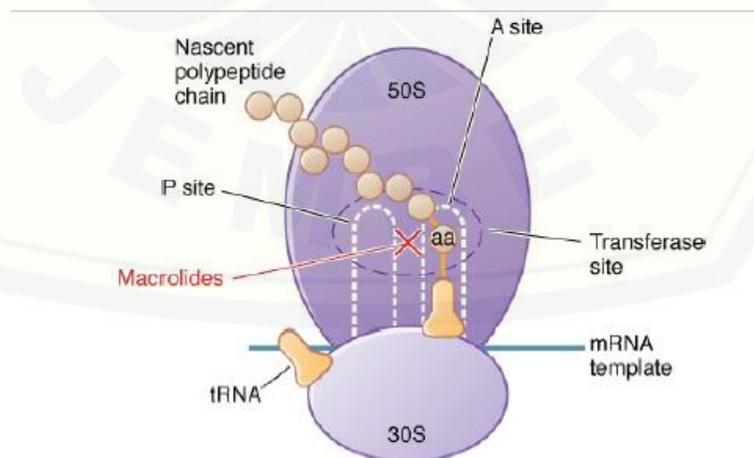
Gambar 2.1 Struktur kimia eritromisin (C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>13</sub>) (Rosaleen *et al.*, 2012)

Merk dagang eritromisin yang umum dijumpai antara lain Eritromisin (obat generik) Corsatrosin, Dothrosin, Duramisin, Ericoat Forte, Eriderm, Erisanbe, Erithrin, Erithrosin, Jerasin, Narlesin, Opithrosin, Pharothrosin (Sutedjo, 2008).

### 2.1.2 Farmakokinetik dan Farmakodinamik

Aktivitas antimikrobal eritromisin biasanya bakteriostatik namun bisa saja bakterisidal pada konsentrasi yang tinggi terhadap bakteri yang sensitif. Antibiotik ini paling aktif secara *in vitro* terhadap bakteri kokus gram positif dan basil. *Staphylococcus* dikatakan *susceptible* pada MIC  $<0.5 \mu\text{g/ml}$  dan *streptococcus* pada  $<0.25 \mu\text{g/ml}$ . Eritromisin kurang sensitif terhadap bakteri aerobik gram negatif, contohnya seperti *H. influenza* dan *N. Meningitidis* (Brunton *et al.*, 2010).

Mekanisme aksi makrolid sebagai agen bakteriostatik adalah menghambat sintesis protein bakteri dengan cara melekat pada subunit ribosom 50S. Eritromisin tidak menghambat pembentukan ikatan peptida melainkan menghambat tahap translasi yaitu molekul peptidil tRNA yang baru terbentuk berpindah dari *acceptor site* (A site) pada ribosom ke *peptidyl donor site* (P site). Sel bakteri diketahui lebih permeabel terhadap bentuk obat yang tidak terionisasi, yang selanjutnya menjelaskan terjadinya peningkatan kerja antibiotik pada pH basa (Brunton *et al.*, 2010). Mekanisme aksi makrolid diilustrasikan pada gambar berikut.



Gambar 2.2 Mekanisme aksi makrolid (Sumber: Brunton *et al.*, 2010)

Eritromisin basa hampir semuanya diabsorpsi mulai dari usus halus dan obat ini dapat diinaktivasi oleh asam lambung sehingga diberikan dalam bentuk tablet salut enterik. Makanan, yang dapat meningkatkan asam lambung, mungkin dapat mengganggu penyerapan (Katzung *et al.*, 2014).

Puncak konsentrasi obat pada serum 0,3-0,5 µg/ml, 4 jam setelah mengkonsumsi 250mg eritromisin basa dan 0,3–1,9 µg/ml setelah mengkonsumsi eritromisin 500mg *single dose*. Ester dari eritromisin basa (stearat, estolat, etilsuksinat) dapat meningkatkan stabilitas keasaman dan absorpsinya kurang dipengaruhi oleh makanan. Konsentrasi eritromisin basa yang aktif pada serum tergantung pada berbagai penyiapan obatnya (Brunton *et al.*, 2010).

Eritromisin berdifusi aktif dalam cairan intraseluler sehingga didapati efek antimikrobal hampir di seluruh tubuh kecuali pada otak. Hanya 2-5% dari eritromisin yang diminum oral yang terekskresi dalam bentuk yang aktif di urin. Antibiotik akan terkonsentrasi di hepar dan diekskresikan di empedu yang mungkin mengandung 250µg/ml ketika konsentrasi antibiotik di serum sangat tinggi. Waktu paruh untuk eliminasi eritromisin adalah 1,6 jam (Brunton *et al.*, 2010).

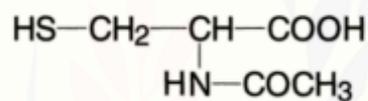
### 2.1.3 Dosis dan Penggunaan

Antibiotik golongan makrolid adalah obat yang cocok untuk penatalaksanaan infeksi saluran pernafasan, karena aktivitasnya yang sensitif terhadap *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus sp.* dan berbagai patogen atipikal (*mycoplasma*, *Chlamydomphilia*, *Legionella*). Selain itu, eritromisin juga pilihan terapi untuk infeksi kulit seperti erysipelas dan selulitis pada pasien yang resisten terhadap golongan penisilin. Eritromisin juga efektif untuk terapi infeksi klamidia. Dosis untuk orang dewasa 1-2gram/hari dosis terbagi, dan diberikan setiap 6 jam. Eritromisin basa tersedia dalam 2 jenis, tablet *immediate release (film-coated)*, dan *delayed release (enteric coated)* (Brunton *et al.*, 2010).

## 2.2 N-asetilsistein

### 2.2.1 Pengertian

N-asetilsistein merupakan antioksidan endogen dan prekursor glutathion intraseluler yang mengandung senyawa sulfhidril atau gugus thiol. N-asetilsistein adalah suatu obat mukolitik dan antioksidan yang digunakan untuk mencegah eksaserbasi dari bronkitis kronik, mencegah kerusakan hepar akibat terapi obat paracetamol, dan mengatasi kondisi stres oksidatif. N-asetilsistein meningkatkan kadar sistein dan glutathion dalam plasma yang memiliki antioksidan, nukleofilik dan mukolitik (Barrie *et al.*, 2010). N-asetilsistein sebagai agen mukolitik dapat memutuskan rantai disulfid mukoprotein sehingga mukus menjadi lebih encer (Ekacipta, 2012). Struktur kimia N-asetilsistein ditunjukkan oleh Gambar 2.3



**N-Acetylcysteine**

Gambar 2.3 Struktur kimia N-asetilsistein (Roboz, 2002)

### 2.2.2 Farmakokinetik & Farmakodinamik

N-asetilsistein merupakan prekursor glutathion intraseluler yang diketahui terkenal sebagai agen nukleofilik dan penghambat radikal bebas atau sebagai sumber sistein dan glutathion. Absorbsinya pada pemberian oral dapat mencapai puncak konsentrasi plasma pada 1-2 jam pemberian. Bioavailabilitas diestimasikan antara 4-10% tergantung pada jumlah obat yang sudah berkurang atau dari bentuk total. Di dalam plasma, N-asetilsistein bisa ditemukan dalam bentuk intak, berkurang atau bentuk teroksidasi (Barrie *et al.*, 2010).

Distribusinya menunjukkan bahwa volume distribusi dari N-asetilsistein total bervariasi dari 0.33 sampai 0.47l/kg. Dua jam setelah pemberian, distribusi ke jaringan dengan urutan sebagai berikut: ginjal, hepar, kelenjar adrenal, paru, limpa, darah, otak

dan urin. Metabolisme/ekskresi dari N-asetilsistein akan menjadi metabolitnya yaitu sistein/sistin (Barrie *et al.*, 2010).

Banyak studi yang menunjukkan efektivitas dan keamanan N-asetilsistein yang tidak hanya bermanfaat untuk kasus infeksi pernafasan akut seperti batuk produktif, influenza, bronkitis akut, dan pneumonia, tetapi juga pada kasus infeksi saluran pernafasan kronis yaitu bronkitis kronis, penyakit paru obstruktif kronis atau PPOK, fibrosis pulmoner idiopatik, dan atelektasis (Ekacipta, 2012).

### 2.2.3 Kombinasi Antibiotik dan N-asetilsistein

Kombinasi N-asetilsistein dan tigesiklin dilaporkan secara sinergis dapat mengeradikasi bakteri yang tertanam dalam lapisan *biofilm* dan sejumlah bakteri lainnya pada kasus bronkitis kronis. Pasien rawat inap dalam kondisi berat juga direkomendasikan untuk diberikan infus dengan *Hi-dose* N-asetilsistein (Hidonac) dengan dosis 600-1200 mg selama 4 jam (Zhao dan Liu, 2010).

Pada kasus infeksi saluran pernafasan, N-asetilsistein tidak hanya digunakan karena efek mukolitiknya, tetapi juga karena profil antioksidannya. Proses infeksi akan memicu terbentuknya radikal bebas berupa pelepasan mediator proinflamasi dan antioksidan serta reaksi imun-inflamatorik dalam tubuh. Reaksi ini seringkali tidak seimbang atau maladaptif sehingga menyebabkan jejas sel dan/atau jaringan. Pemberian N-asetilsistein sebagai suplementasi terapi antioksidan akan membantu tubuh dalam mengatasi antimikrobal dan mengontrol reaksi infeksi (Zhao dan Liu, 2010).

N-asetilsistein memiliki kemampuan antibakterial dan dapat mencegah pembentukan biofilm pada bakteri meskipun tidak tergolong sebagai antibiotik. Suatu penelitian melaporkan bahwa, selain memiliki kemampuan antibakterial, N-asetilsistein dapat mencegah perlekatan *S. epidermidis* pada peralatan intravaskular dan prostetik (Zhao dan Liu, 2010).

Kombinasi N-asetilsistein dengan antibiotik empiris dalam kasus infeksi saluran pernafasan akut dan kronik dinilai rasional karena beberapa alasan berikut.

Pertama, N-asetilsistein dapat berperan sebagai antioksidan direk dan tidak langsung untuk mengisi ulang kadar glutathion interseluler yang berkurang sesuai peningkatan usia, inflamasi, stres oksidatif, infeksi, serta penyakit kronis. Kedua, N-asetilsistein dapat berperan sebagai mukolitik dan mampu mengaktifasi sistem mukosilier saluran napas. Ketiga, N-asetilsistein dapat menghambat pembentukan lapisan *biofilm* oleh *Pseudomonas aeruginosa*, *Eschericia coli*, dan *Klebsiella* (Ekacipta, 2012).

Selain data mengenai kemampuan N-asetilsistein dalam meningkatkan kinerja antibiotik, terdapat pula beberapa penelitian yang menyebutkan kombinasi antibiotik dan N-asetilsistein tidak memiliki efek terhadap kerja antibiotik dan justru menghambat kerja antibiotik.

Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Goswami *et al.*, tahun 2010 mengenai efek N-asetilsistein terhadap antibiotik menghasilkan kesimpulan bahwa adanya N-asetilsistein bisa menurunkan kemampuan antibakterial antibiotik golongan aminoglikosid, fluoroquinolon dan eritromisin. N-asetilsistein bisa dianggap memodulasi kerja antibiotik dalam menghambat bakteri. Walaupun mekanisme spesifik N-asetilsistein dalam memodulasi kemampuan antibiotik masih belum jelas, namun keberadaan gugus thiol pada N-asetilsistein mungkin berpengaruh pada kerja antibiotik.

N-asetilsistein sebagai agen antioksidan (prekursor glutathion) juga telah diteliti berefek negatif terhadap perkembangan penyakit infeksi. Perbedaan struktur biokimia dan faktor fisiologis (termasuk konsumsi antioksidan) akan berpengaruh terhadap aktivitas terapeutik antibiotik. Adanya glutathion, N-asetilsistein atau *ascorbic acid* pada media pertumbuhan bakteri ternyata dapat menurunkan aktivitas antibakteri antibiotik golongan aminoglikosid dan fluoroquinolon.

Efek antioksidan terhadap sensitivitas antibiotik pertama kali dianalisis menggunakan metode uji *disk diffusion*. Penurunan zona hambat di sekitar disk streptomisin dan ciprofloxacin menandakan keberadaan 10mM glutathion atau *ascorbic acid* pada medium pertumbuhan menyebabkan penurunan aktivitas antibakteri streptomisin dan ciprofloxacin terhadap strain bakteri *E. Coli*.

Streptomisin adalah antibiotik yang berikatan dengan ribosom subunit 30S dan mengganggu sintesis protein sehingga menyebabkan kesalahan translasi dan menyebabkan akumulasi protein yang salah. Glutation kemungkinan mampu melindungi bakteri dengan cara mengatasi kesalahan translasi yang dilakukan oleh streptomisin (Goswami *et al.*, 2011).

Penelitian secara *in vivo* juga pernah dilakukan untuk menguji efek penambahan antioksidan terhadap peritonitis bakterial. Kelompok perlakuan mencit yang telah diinjeksi bakteri *E.coli strain* non-pathogen akan menginduksi peritonitis pada mencit. Selanjutnya larutan N-asetilsistein dan *ascorbic acid* diinjeksikan ke mencit secara intraperitoneal. Mencit yang telah mengalami peritonitis selanjutnya dimonitor ketahanannya. Kelompok perlakuan yang telah diinjeksi antioksidan ternyata menunjukkan peningkatan signifikan terhadap mortalitas mencit dibanding kelompok kontrol. Kelompok kontrol yang hanya diinjeksi *E. coli* tidak menunjukkan mortalitas selama 30 hari pengamatan. Selain itu, adanya antioksidan menyebabkan penurunan bakteri intraseluler yang menandakan adanya penghambatan terhadap fagositosis bakteri (Goswami *et al.*, 2014).

#### 2.2.4 Interaksi Obat Eritromisin dan N-asetilsistein

N-asetilsistein memiliki gugus thiol yang dapat bereaksi dengan antibiotik. Beberapa antibiotik seperti streptomisin dan penicillin akan bereaksi secara langsung saat kontak dengan gugus sulfhidril atau gugus thiol pada N-asetilsistein (Cavallito, dalam Goswami *et al.*, 2007). Suatu penelitian telah dilakukan untuk mencari pengaruh glutation terhadap cycloheximide yaitu antibiotik yang bekerja dengan cara menghambat translasi pada sintesis protein bakteri. Cycloheximide mengandung senyawa kimia  $\beta$ -hidroksiketon, yang mudah melepas air. Ketika cycloheximide kehilangan air, akan terbentuk  $\alpha\beta$ -unsaturatedketon yang senyawa karbonilnya reaktif terhadap gugus thiol dari glutation. Hal inilah yang mendasari kombinasi antibiotik ini dengan gugus thiol mampu mencegah inhibisi pada inisiasi dan translasi sintesis protein bakteri (Kosower, dalam Goswami *et al.*, 2007). Eritromisin serupa dengan

cycloheximid dalam hal farmakodinamik dan struktur kimianya. Eritromisin juga bekerja dengan cara menghambat sintesis protein dan memiliki gugus hidroksiketon pada molekulnya (Slawinski *et al.*, 2010).

Saat eritromisin dikombinasikan dengan N-asetilsistein, gugus hidroksiketon yang kehilangan air akan menjadi  $\alpha\beta$ -unsaturatedketon, senyawa karbonil pada gugus ini akan bereaksi aktif dengan gugus thiol dari N-asetilsistein. Interaksi obat ini dapat berpengaruh terhadap farmakodinamik eritromisin dalam menghambat pertumbuhan bakteri, karena akan terjadi pencegahan inhibisi sintesis protein bakteri (Kosower, dalam Goswami *et al.*, 2007).

## 2.3 *Streptococcus pneumoniae*

### 2.3.1 Morfologi Bakteri

*S.pneumoniae* atau pnemokokus adalah diplokokus gram-positif yang merupakan flora normal pada saluran pernapasan bagian atas manusia. *S. Pneumoniae* merupakan *fastidious organism* atau organisme yang membutuhkan nutrisi yang kompleks untuk dapat tumbuh (CDC, 2012). Klasifikasi taksonomi untuk bakteri *S. pneumoniae* tertera pada Tabel 2.1. Bakteri ini berbentuk bulat hingga lanset, tersusun dalam bentuk rantai, mempunyai simpai polisakarida yang mempermudah penentuan tipe dengan antiserum spesifik (Gillespie *et al.*, 2006). Panjang rantai sangat bervariasi dan sebagian besar ditentukan oleh faktor lingkungan. Rantai panjang akan muncul bila ditanam dalam media yang hanya sedikit mengandung magnesium (Brooks *et al.*, 2007). Pneumokokus mudah dilisis oleh zat aktif permukaan, misalnya garam-garam empedu. Zat aktif permukaan mungkin menghilangkan atau menonaktifkan penghambat autolisis dinding sel (Brooks *et al.*, 2007).

Tabel 2.1 Taksonomi *Streptococcus pneumoniae*

Taksonomi bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Kingdom	Bacteriae
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Ordo	Lactobacilales
Family	Streptocaceae
Genus	<i>Streptococcus</i>
Spesies	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Sumber: Vasanthakumari, 2007

Diplokokus gram positif berbentuk lanset yang khas ini (Gambar 2.4) sering ditemukan dalam spesimen kultur berusia muda. Dalam sputum atau pus, tampak pula kokus tunggal atau rantai kokus. Dengan bertambahnya usia kultur, organism cepat berubah menjadi gram negatif dan cenderung mengalami lisis spontan. Autolisis pneumokokus sangat ditingkatkan oleh agen aktif permukaan. Lisis pneumokokus terjadi dalam beberapa menit ketika empedu lembu (10%) atau natrium deoksilat (2%) ditambahkan ke dalam kultur kaldu atau suspensi bakteri dalam suasana pH netral.

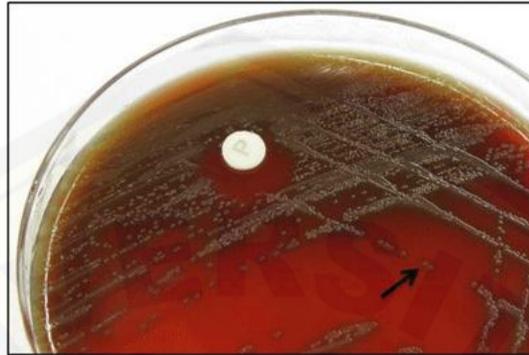


Gambar 2.4 Morfologi *Streptococcus pneumoniae* (Sleator, 2010)

### 2.3.2 Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan

*S. pneumoniae* akan tumbuh bila dikultur pada media yang mengandung darah (*Blood Agar Plate*) atau bisa juga ditumbuhkan pada *Chocolate Agar Plate*. Pada media *blood agar*, koloni *S. pneumoniae* tampak lembab hingga mukoid, berwarna abu-abu, dan di sekitar koloni timbul zona alfa hemolisis yang berwarna hijau

(Kayser *et al.*, 2005). Pertumbuhan *S. pneumoniae* pada *blood agar* ditunjukkan pada Gambar 2.5 berikut.



Gambar 2.5 Koloni *S. pneumoniae* pada *blood agar* (CDC, 2012)

Pertumbuhan *S. pneumoniae* cenderung menjadi kurang subur pada perbenihan padat atau dalam kaldu, kecuali yang diperkaya dengan darah atau cairan jaringan. Kuman yang patogen bagi manusia paling banyak memerlukan faktor-faktor pertumbuhan. Pertumbuhan dan hemolisis dibantu oleh pengeraman dalam CO<sub>2</sub> 5-10%. Kebanyakan Streptococcus patogen tumbuh paling baik pada suhu 37° C. Kebutuhan makanan bervariasi untuk setiap spesies (Husain, 2012). Sebagian besar energi diperoleh dari fermentasi glukosa, hal tersebut disertai dengan produksi cepat asam laktat yang membatasi pertumbuhan sehingga penetralan dengan basa setiap interval tertentu pada kultur kaldu menyebabkan pertumbuhan yang masif (Brooks *et al.*, 2013).

Varian strain Streptococcus yang sama dapat menunjukkan bentuk koloni yang berbeda. Organisme ini cenderung virulen dan terbungkus kapsul polisakarida sehingga relatif kebal terhadap fagositosis oleh leukosit manusia (Brooks *et al.*, 2007).

### 2.3.3 Infeksi akibat *Streptococcus pneumoniae*

*Pneumococcus* menyebabkan penyakit melalui kemampuan mereka memperbanyak diri di jaringan. Mereka tidak menghasilkan toksin yang bermakna. Virulensi organisme tersebut terletak pada fungsi kapsulnya yang mencegah atau

menghambat pencernaan oleh fagosit. Serum yang mengandung antibodi terhadap polisakarida spesifik melindungi dari infeksi. Jika serum tadi diserap dengan polisakarida tipe spesifik, serum tersebut akan kehilangan daya proteksinya. Hewan atau manusia yang diimunisasi dengan tipe polisakarida *pneumococcus* tertentu akan menjadi kebal terhadap tipe *pneumococcus* tersebut dan memiliki antibody yang dapat mempresipitasi dan mengopsonisasi tipe polisakarida tadi (Brooks *et al.*, 2013).

Infeksi *pneumococcus* menyebabkan aliran hebat cairan edema fibrinosa ke dalam alveoli, diikuti masuknya eritrosit dan leukosit yang menyebabkan konsolidasi bagian-bagian paru. Banyak *pneumococcus* yang ditemukan dalam eksudat tersebut, dan dapat mencapai aliran darah melalui aliran limfatik paru. Dinding alveolus tetap utuh selama infeksi. Selanjutnya sel mononukleus memfagositosis debris secara aktif dan fase cair tersebut direabsorpsi secara bertahap. *Pneumococcus* diingesti oleh fagosit dan dicerna secara intraseluler (Brooks *et al.*, 2013).

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Streptococcus pneumoniae*, salah satunya adalah pneumonia. Pneumonia merupakan suatu penyakit infeksi saluran nafas bawah. Pneumonia adalah peradangan yang mengenai parenkim paru, distal dari bronkiolus terminalis yang mencakup bronkiolus respiratorius, dan alveoli serta menimbulkan konsolidasi jaringan paru dan gangguan pertukaran gas setempat. Pneumonia secara klinis dibagi menjadi pneumonia yang terjadi akibat infeksi di luar rumah sakit (Pneumonia Komuniti) dan pneumonia yang terjadi di rumah sakit (Pneumonia Nosokomial). Cara penularan pneumonia berkaitan dengan jenis kuman yang menyebabkan. Misalnya infeksi melalui *droplet* sering disebabkan oleh *Streptococcus pneumoniae*, oleh slang infus oleh *Staphylococcus aureus*, sedangkan infeksi pada pemakaian ventilator oleh kuman *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterobacter* (Sudoyo *et al.*, 2009).

Diagnosis pada penyakit pneumonia didasarkan pada tanda dan gejala, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan penunjang. Tanda dan gejala penyakit pneumonia antara lain demam hingga  $>38^{\circ}\text{C}$ , batuk, terutama batuk yang memproduksi banyak

sputum, hipotermia, takipnea, takikardia, penggunaan otot bantu pernafasan. Selain itu pada pemeriksaan fisik biasanya terdapat tanda konsolidasi paru seperti perkusi yang pekak, rhonki nyaring, dan suara pernafasan bronkial (Sudoyo *et al.*, 2009).

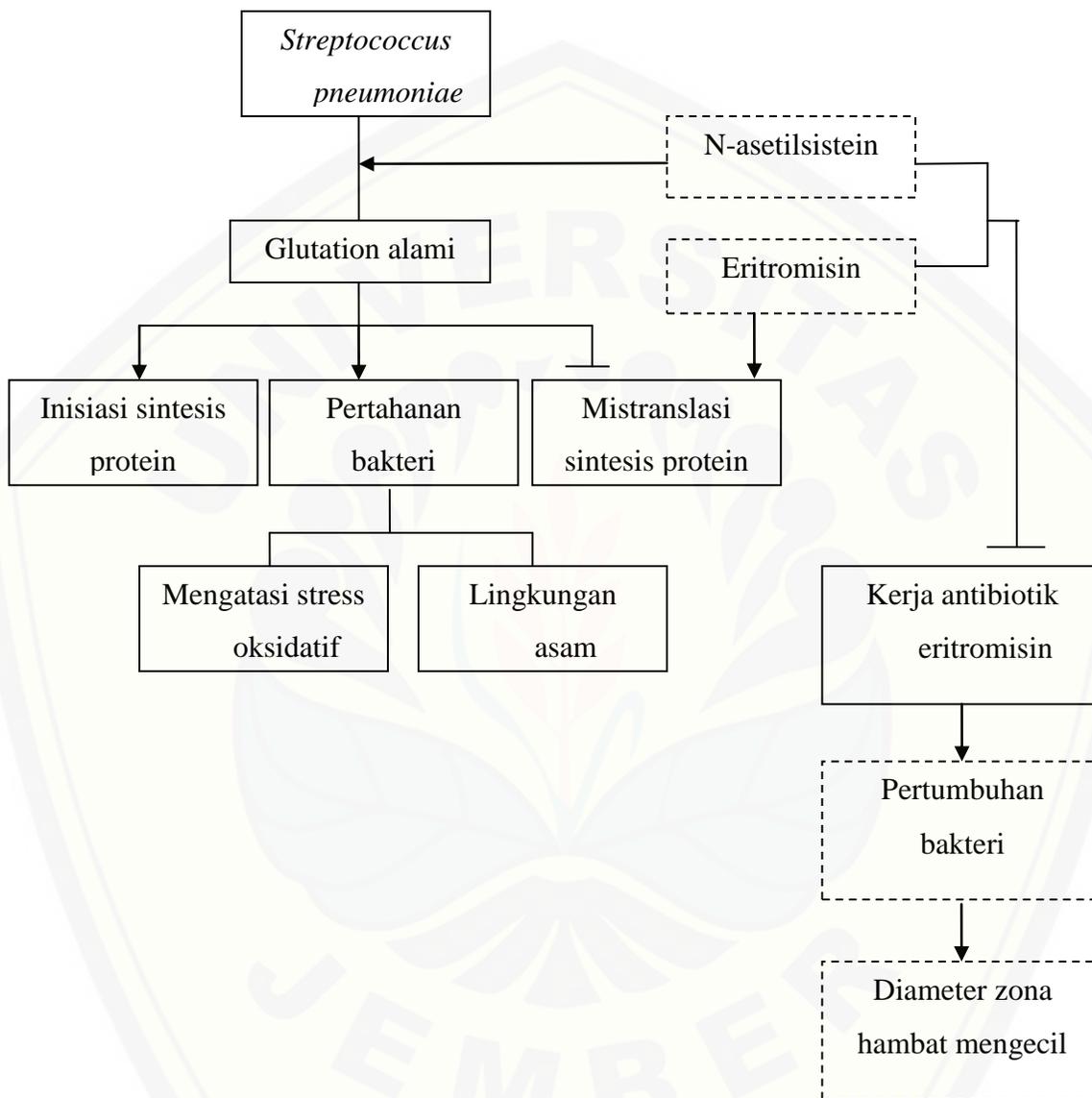
Penatalaksanaan pneumonia terdiri atas pemberian antibiotik empirik, yang ditujukan untuk patogen yang paling mungkin menjadi penyebab. Bila telah ada hasil kultur, dilakukan penyesuaian obat. Berdasarkan *American Thoracic Society*, antibiotik yang menjadi rekomendasi kuat untuk terapi awal pada pneumonia adalah antibiotik golongan makrolid (eritromisin, azitromisin dan claritromisin). Selain itu, diberikan juga terapi simptomatik berupa agen mukolitik dan ekspektoran untuk mengatasi gejala batuk (PDPI, 2003).

#### 2.3.4 Glutation Alami pada *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus*, *enterococcus* dan *proteobacteria* termasuk dalam bakteri yang memiliki antioksidan alami, yaitu glutation. Keberadaan glutation di dalam bakteri akan membantu bakteri untuk bertahan terhadap lingkungan asam, kondisi stres oksidatif, maupun stress osmotik (Masip *et al.*, 2006). Selain itu, jumlah glutation yang cukup akan memulai inisiasi sintesis protein pada bakteri. Sehingga proses sintesis protein bakteri akan berjalan maksimal. Adanya glutation juga akan mencegah terjadinya kesalahan translasi (*mistranslasi*) akibat kerja antibiotik penghambat sintesis protein (Willner, dalam Goswami *et al.*, 2007).

Adanya glutation alami pada bakteri menunjukkan bahwa bakteri mampu melakukan biosintesis glutation dalam tubuhnya. Pemenuhan glutation tubuh bakteri selain melalui biosintesis juga melalui mekanisme transportasi glutation dari sumber ekstraseluler. Untuk mendapatkan glutation ekstraseluler diperlukan protein transporter yang disebut *gshT* (glutation transporter) pada *S.pneumoniae*. Transkripsi *gshT* diaktivasi oleh *CysR* (*cysteine synthesis regulator*). Menghilangkan sistein dari CDM (*chemically defined medium*) menyebabkan gangguan pada pertumbuhan *S. pneumoniae* dan glutation intraseluler. Selain itu, *gshT* juga berperan dalam proliferasi *S. pneumoniae* dalam darah (Potter *et al.*, 2012).

2.4 Kerangka Teori



Gambar 2.6 Kerangka Teori

Keterangan:

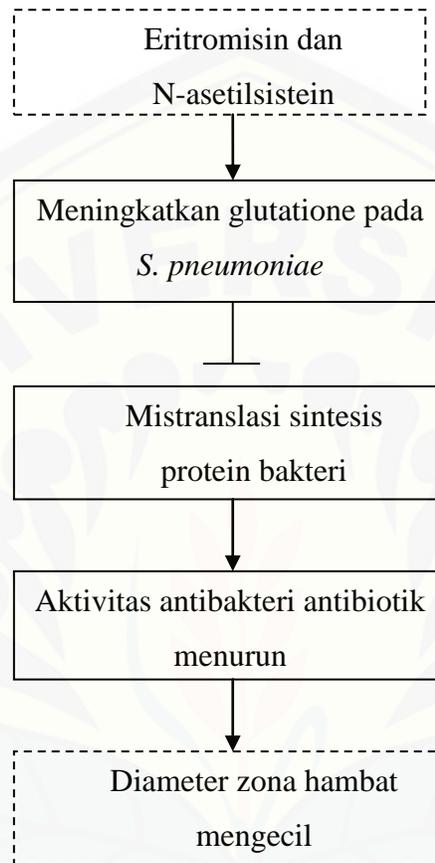
- : memicu
- | : menghambat
- - - : diteliti
- : tidak diteliti

*Streptococcus pneumoniae* termasuk kelompok bakteri yang memiliki antioksidan alami, yaitu glutathione (Masip *et al.*, 2006). Keberadaan glutathione di dalam bakteri akan membantu bakteri untuk bertahan terhadap lingkungan asam, kondisi stres oksidatif, maupun stress osmotik (Potter *et al.*, 2012). N-asetilsistein suatu prekursor antioksidan endogen yaitu prekursor sistein dan glutathione, bila diberikan pada medium yang telah ditumbuhi bakteri, maka N-asetilsistein akan meningkatkan jumlah glutathione pada bakteri. Padahal glutathione ini dalam jumlah yang cukup akan memulai inisiasi sintesis protein pada bakteri sehingga proses sintesis protein bakteri akan berjalan maksimal (Willner, dalam Goswami, 2007).

Eritromisin sebagai antibiotik akan bekerja menghambat sintesis protein dan menyebabkan mistranslasi terhadap protein bakteri yang terbentuk. Namun, adanya glutathione akan mencegah terjadinya kesalahan translasi (mistranslasi) pada sintesis protein.

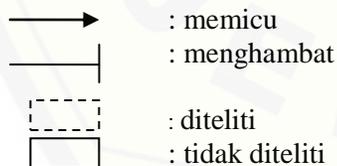
Kerja eritromisin dan N-asetilsistein berlawanan, sehingga jika kedua obat ini dikombinasikan maka akan menyebabkan penurunan aktivitas antibakteri antibiotik. Sehingga bakteri akan tetap tumbuh dan digambarkan dengan diameter zona hambat yang mengecil dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## 2.5 Kerangka Konsep



Gambar 2.7 Kerangka Konsep

Keterangan:



N-asetilsistein akan menyebabkan peningkatan kadar glutathione pada bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Glutathione akan mencegah kesalahan translasi (mistranslasi) sintesis protein bakteri. Sedangkan eritromisin bekerja dengan cara menyebabkan mistranslasi sintesis protein bakteri. Sehingga ketika eritromisin dan N-

asetilsistein dikombinasikan akan menyebabkan menurunnya aktivitas antibakteri eritromisin terhadap *Streptococcus pneumoniae* yang ditunjukkan dengan diameter zona hambat yang mengecil.

## 2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini antara lain.

- a. Kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein akan memberi efek negatif yaitu menurunkan penghambatan pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*.
- b. Hasil uji sensitivitas kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein terhadap pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* menunjukkan diameter zona hambat menurun sesuai dengan peningkatan konsentrasi N-asetilsistein yang ditambahkan dalam kombinasi.
- c. Konsentrasi minimal N-asetilsistein dalam kombinasi yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri eritromisin dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* adalah pada rentang 0,5-1,25 mg/ml.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

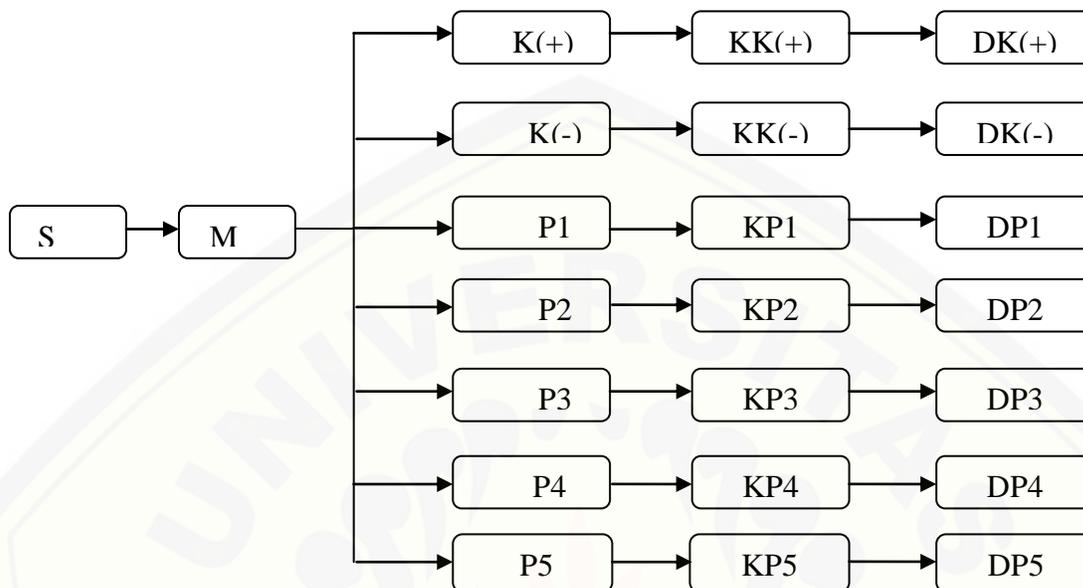
Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental, karena penelitian ini memberikan perlakuan terhadap obyek yang dapat mengendalikan variabel dan secara tegas menyatakan ada hubungan sebab akibat (Lusiana, 2015). Jenis penelitian eksperimental yang digunakan adalah *quasy experimental*.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan menggunakan rancangan penelitian *posttest only control group design*, yang merupakan rancangan eksperimental tanpa ada pengukuran awal (*pretest*), tetapi hanya pengukuran akhir (*posttest*) (Pratiknya, 2003).

Rancangan penelitian ini dilakukan dengan membagi sampel dalam kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok perlakuan yang terdiri dari 7 kelompok yaitu 5 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol (negatif dan positif). Rancangan penelitian dan pengulangan dapat dilihat pada skema 3.1.

Kelompok yang diberi perlakuan terdiri atas pemberian antibiotik eritromisin saja 15 $\mu$ g/5 $\mu$ l (kontrol positif), dan pemberian kombinasi N-asetilsistein dengan konsentrasi 1.25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml dan antibiotik eritromisin 15 $\mu$ g/5 $\mu$ l. Kelompok kontrol negatif menggunakan aquades.



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

## Keterangan :

- S : Sampel bakteri *S. pneumoniae*  
 M : Media  
 K(-) : Bakteri *S. pneumoniae* + aquadest  
 K(+) : Bakteri *S. pneumoniae* + eritromisin 15 µg/5µl  
 P<sub>1</sub> : Bakteri *S. pneumoniae* + eritromisin 15 µg/5µl + NAC 1,25mg/ml  
 P<sub>2</sub> : Bakteri *S. pneumoniae* + eritromisin 15 µg/5µl + NAC 2,5mg/ml  
 P<sub>3</sub> : Bakteri *S. pneumoniae* + eritromisin 15 µg/5µl + NAC 5mg/ml  
 P<sub>4</sub> : Bakteri *S. pneumoniae* + eritromisin 15 µg/5µl + NAC 10 mg/ml  
 P<sub>5</sub> : Bakteri *S. pneumoniae* + eritromisin 15 µg/5µl + NAC 20 mg/ml  
 KK(+) : Perlakuan terhadap kelompok kontrol positif berupa uji sensitivitas  
 KK(-) : Perlakuan terhadap kelompok kontrol negatif berupa uji sensitivitas  
 KP(1-5):Perlakuan terhadap kelompok perlakuan 1 sampai 5 berupa uji sensitivitas  
 DK(+) : Diameter zona hambat pada kelompok kontrol positif  
 DK(-) : Diameter zona hambat pada kelompok kontrol negatif  
 DP(1-5): Diameter zona hambat pada kelompok perlakuan 1 sampai 5

### 3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang didapatkan dari Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya. Pengulangan yang dilakukan dihitung berdasarkan rumus Federer (Hanafiah, 2003) berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Dimana t adalah jumlah perlakuan dan r adalah jumlah pengulangan, sehingga

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

$$6r-6 \geq 15$$

$$r \geq 3,5$$

Setelah dihitung menggunakan rumus Federer, didapatkan jumlah pengulangan yang harus dilakukan harus lebih dari 3,5. Sehingga pada penelitian ini pengulangan yang dilakukan sebanyak 4 kali.

### 3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Persiapan strain bakteri, persiapan pengenceran obat, pembuatan media dan uji sensitivitas dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan kurang lebih selama 1,5 bulan yaitu di bulan Oktober - Desember 2015.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi N-asetilsistein sebagai obat kombinasi.

### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penghambatan pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* yang ditunjukkan oleh diameter zona hambat.

### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol penelitian ini meliputi:

- a. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pneumoniae* dan Muller Hinton Agar
- b. Penghitungan konsentrasi obat
- c. Lama inkubasi
- d. Suhu inkubasi

## 3.6 Definisi Operasional

### 3.6.1 *Streptococcus pneumoniae*

Bakteri yang digunakan adalah isolat *Streptococcus pneumoniae* yang diambil dari apusan nasofaring pasien yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

### 3.6.2 Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri yang dimaksud pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni *Streptococcus pneumoniae* pada media MHA (Muller Hinton Agar) yang ditambah dengan 5% darah domba. Pertumbuhan bakteri ini dapat dihambat dengan adanya cakram antibiotik eritromisin dan cakram kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein yang ditunjukkan dengan zona bening di sekitar cakram atau diameter zona hambat.

### 3.6.3 Eritromisin

Eritromisin yang digunakan dalam penelitian ini adalah eritromisin generik dengan merek dagang erythromycin 500mg. Eritromisin diberikan dalam konsentrasi

yang sama pada setiap kelompok perlakuan yaitu  $15\mu\text{g}/5\mu\text{l}$  sesuai dengan dosis potensi eritromisin (CLSI, 2012).

#### 3.6.4 N-asetilsistein

N-asetilsistein yang digunakan adalah N-asetilsistein dengan merk dagang flumucyl sediaan kapsul 200mg. N-asetilsistein disiapkan dulu (*stock solution*), lalu diberikan dalam konsentrasi yang berbeda pada setiap kelompok perlakuan, untuk mengetahui efek perbedaan konsentrasi terhadap diameter zona hambat. Konsentrasi N-asetilsistein yang digunakan berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Domenech *et al.*, 2012 yang menyebutkan bahwa pada konsentrasi 2,5mg/ml, N-asetilsistein mampu mencegah dan merusak biofilm yang terbentuk pada *S.pneumoniae* (Domenech *et al.*, 2012). Sehingga pada penelitian ini, digunakan konsentrasi dibawah 2,5mg/ml dan diatas 2,5mg/ml yaitu konsentrasi 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, dan 20mg/ml.

#### 3.6.5 Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein

Kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein dilakukan dengan cara mencampur *stock solution* eritromisin dengan konsentrasi tetap yaitu  $15\mu\text{g}/5\mu\text{l}$  dan N-asetilsistein dengan konsentrasi berbeda pada tiap kelompok perlakuan yaitu 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, dan 20mg/ml ke dalam vial.

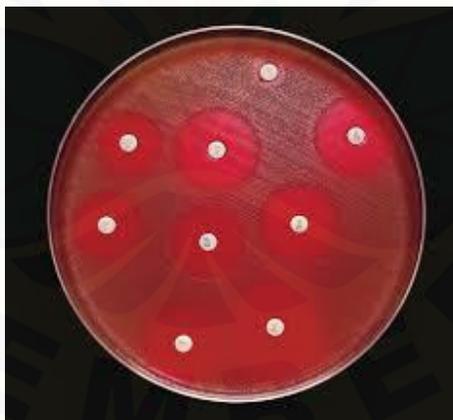
#### 3.6.6 Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas adalah suatu tes yang digunakan untuk menguji kepekaan suatu bakteri terhadap antibiotik. Uji kepekaan/sensitivitas bertujuan untuk mengetahui dayakerja/efektivitas dari suatu antibiotik dalam menghambat/membunuh bakteri. Uji sensitivitas pada penelitian ini dilakukan dengan metode *disc diffusion*. Metode *disk diffusion* adalah suatu uji yang tergantung dari konsentrasi agen antimikroba yang secara radial mengalami difusi pada media agar. Konsentrasi obat akan menurun bersamaan dengan pertambahan jarak dari disk, hingga pada suatu titik

tertentu, jumlah obat pada lokasi spesifik tersebut sudah tidak mampu lagi menghambat organisme yang diuji sehingga terbentuklah zona penghambatan berupa zona terang pada media (Cavalieri, 2005).

### 3.6.7 Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat adalah area penghambatan di sekeliling cakram kertas yang ditimbulkan dari kerja antibiotik dalam cakram tersebut yang ditandai dengan area berwarna terang/bening. Diameter zona hambat tersebut diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan mm. Untuk mengurangi subyektifitas, pengukuran dilakukan menggunakan metode random, yaitu dengan memberi kode pada zona hambat yang terbentuk tanpa diketahui konsentrasinya dan dilakukan oleh 2 orang pengamat yang telah dipastikan mengetahui cara mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong karena berpedoman pada CLSI, 2012. Diameter zona hambat yang terbentuk pada Muller Hinton Agar yang disuplementasi dengan 5% darah domba terlihat seperti gambar berikut.

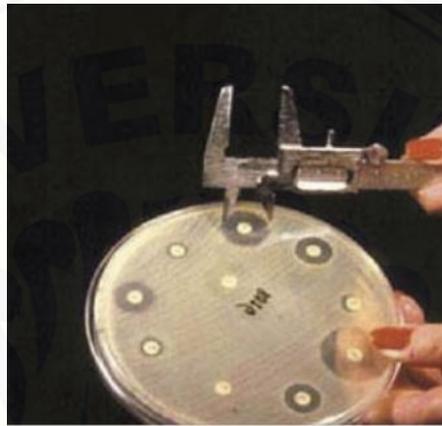


Gambar 3.2 Zona hambat pada MHA yang disuplementasi dengan 5% darah domba. Zona hambat berwarna merah bening karena media pada awalnya berwarna merah (Sumber: Cavalieri, 2005).

### 3.6.8 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada sisi belakang cawan petri

yang menunjukkan zona hambat yang jelas. Pengukuran dengan jangka sorong dilakukan dengan cara meletakkan rahang diameter jangka sorong tepat pada tepi zona hambat lalu diputar mur penguncinya hingga rahang terbuka selebar diameter zona hambat yang akan diukur (Cavalieri, 2005). Pengukuran dilakukan seperti gambar berikut.



Gambar 3.3 Cara pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong (Sumber: Cavalieri, 2005)

Pembacaan pengukuran dengan melihat skala utama terlebih dahulu. Nilai ditetapkan berdasarkan angka pada skala utama yang terletak sebelum angka 0 pada skala nonius. Selanjutnya ditetapkan nilai pengukuran pada skala nonius, yaitu dengan melihat garis yang berhimpitan antara skala utama dan skala nonius, lalu nilai dari skala utama dan skala nonius dijumlahkan (Ryan, 2010).

#### 3.6.9 Interpretasi Efek Kombinasi

Interpretasi efek kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein dilakukan dengan cara membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif. Apabila kelompok perlakuan memiliki diameter zona hambat yang lebih lebar dibanding kelompok kontrol positif berarti menandakan bahwa N-asetilsistein meningkatkan aktivitas antibakteri antibiotik. Sebaliknya bila diameter zona hambat kelompok

perlakuan lebih sempit, berarti menandakan bahwa N-asetilsistein menurunkan aktivitas antibakteri antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

### **3.7 Alat dan Bahan**

#### **3.7.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain mortar dan pistel, vial, *whatmann filter paper*, sterilisator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, ose, inkubator, bunsen, pipet, jangka sorong, sterilisator, spuit 1 ml dan 10 ml, lidi kapas dan mikropipet.

#### **3.7.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain bakteri *Streptococcus pneumoniae*, eritromisin dengan merk dagang erytromisin tablet 500mg, N-asetilsistein dengan merk dagang fluimucyl kapsul 200mg, ethanol 95%, aquades steril, Blood Agar Plate (BAP), Muller Hinton Agar (MHA), darah domba dan spirtus

### **3.8 Prosedur Kerja**

#### **3.8.1 Persiapan Alat**

Semua alat yang akan dipakai dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dalam sterilisator panas kering selama 15 menit dengan suhu 110°C. Cakram kosong juga disiapkan dahulu dengan membuatnya dari *Whatmann filter paper* yang dibentuk dengan pelubang kertas sehingga membentuk cakram berukuran 5mm. Selanjutnya cakram disterilisasi pada suhu 150°C selama 20menit.

#### **3.8.2 Pembuatan Media BAP (*Blood Agar Plate*) dan Peremajaan Bakteri**

Media yang digunakan adalah media *agar base* dalam bentuk serbuk yang telah tersedia dalam kemasan, selanjutnya ditimbang sejumlah 4 gram. Serbuk dilarutkan dalam aquades 100ml diatas kompor listrik sampai larut. Kemudian

disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Setelah 15 menit dinginkan sampai suhu 40° C, kemudian ditambahkan 3 ml darah domba yang steril sambil diaduk/diputar terus agar darah tidak menggumpal. Selanjutnya tuangkan media tersebut ke dalam cawan petri. Diamkan media tersebut pada suhu ruangan, selanjutnya akan muncul warna merah cerah. Jika pada cawan petri muncul merah gelap, kemungkinan penambahan darah dilakukan saat media masih terlalu panas. Selanjutnya media disimpan dalam lemari es, lalu dilakukan peremajaan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dengan menginokulasi bakteri pada *blood agar plate* (CLSI, 2012).

### 3.8.3 Pembuatan Muller Hinton Agar yang Disuplementasi dengan 5% Darah Domba

Media MHA yang digunakan dalam bentuk serbuk yang telah tersedia dalam kemasan, selanjutnya ditimbang sesuai kebutuhan yaitu 17gram serbuk untuk 500ml aquades. Pembuatan media sesuai dengan ketentuan yang tercantum dalam kemasan. Selanjutnya setelah dilakukan *autoclaving*, agar dibiarkan mendingin dalam waterbath bersuhu 45-50° C. Setelah itu tambahkan darah domba sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* agar darah tidak menggumpal. Lalu tuangkan media yang telah dingin pada cawan petri, dan biarkan media sesuai dengan suhu ruangan (CLSI, 2012)

### 3.8.4 Pembuatan *Stock Solution* Eritromisin dan N-asetilsistein

- a. Untuk membuat *stock solution* eritromisin dibutuhkan solvent/pelarut berupa ethanol 95%. Berdasarkan CLSI, dalam satu disk eritromisin potensinya 15µg untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Sehingga dalam penelitian ini dibuat *stock solution* eritromisin dengan konsentrasi 15µg/5µl. Cara pembuatannya dengan menghaluskan satu setengah tablet eritromisin (750mg) lalu ditambahkan 10ml ethanol 95% menghasilkan konsentrasi 75mg/ml. Diambil 1 ml lalu ditambah 4ml sehingga konsentrasinya menjadi 15mg/ml. Diambil lagi 1ml lalu

ditambahkan 4ml sehingga konsentrasi akhirnya menjadi 3mg/ml. Konsentrasi 3mg/ml sama dengan 3 $\mu$ g/ $\mu$ l atau sama dengan 15 $\mu$ g/5 $\mu$ l (CLSI, 2012).

- b. Untuk membuat *stock solution* N-asetilsistein dibutuhkan pelarut aquades. N-asetilsistein disiapkan dalam bentuk serbuk dari kapsul 200mg. Konsentrasi N-asetilsistein yang digunakan berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Domenech *et al.*, 2012 yang menyebutkan bahwa pada konsentrasi 2,5mg/ml, N-asetilsistein mampu mencegah dan merusak biofilm yang terbentuk pada *S.pneumoniae* (Domenech *et al.*, 2012). Sehingga pada penelitian ini, digunakan konsentrasi dibawah 2,5mg/ml dan diatas 2,5mg/ml yaitu konsentrasi 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, dan 20mg/ml. Serbuk dari kapsul N-asetilsistein 200mg selanjutnya dilarutkan dengan 10ml aquades lalu dibuat seri pengenceran hingga memperoleh konsentrasi larutan sebagai berikut: 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, dan 20mg/ml (CLSI, 2012).

### 3.8.5 Pembuatan Suspensi Bakteri

Koloni dipindahkan dengan menggunakan ose dari media agar darah ke aquades steril. Densitas dari suspensi bakteri tersebut harus sesuai dengan 0.5 *Mc Farland standard* ( $1-1,5 \times 10^8$  CFU/ml). Jika tidak sesuai maka diatur/didilusi dengan menambahkan aquades atau menambahkan koloni bakteri, kemudian divortex agar sama dengan standar 0.5 *Mc Farland*. Untuk mempermudah menyesuaikan dengan standar, caranya dengan membandingkan kekeruhan suspensi bakteri dengan *standard tes* pada kertas berlatar belakang putih dan memiliki garis hitam (CLSI, 2012).

### 3.8.6 Inokulasi Bakteri pada MHA dengan Supplementasi 5% Darah Domba

Suspensi bakteri divortex terlebih dahulu untuk memastikan bakteri telah tercampur merata. Celupkan lidi kapas ke dalam suspensi dan tiriskan cairan yang berlebih pada sisi tabung reaksi, lalu oleskan pada media MHA. Ratakan koloni

bakteri pada permukaan media dengan cara mengoleskan menggunakan lidi kapas pada 3 arah sambil diputar  $60^\circ$ . Lalu biarkan agar 3-5 menit (Cavalieri, 2005).

### 3.8.7 Uji Sensitivitas Kombinasi Eritromisin dan N-asetilsistein

Sebelum melakukan uji sensitivitas, dilakukan pencampuran obat terlebih dahulu. Eritromisin dicampur dengan N-asetilsistein berbagai konsentrasi dalam vial. Selanjutnya, cakram kosong diletakkan pada cawan petri, lalu ditetesi larutan obat  $5\mu\text{l}$ , dibiarkan kering dulu, lalu ditetesi lagi  $5\mu\text{l}$ . Letakkan cakram menggunakan pinset pada MHA yang telah diinokulasi bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Untuk kontrol positif, cakram ditetesi dengan larutan eritromisin  $5\mu\text{l}$  dan untuk kontrol negatif, cakram ditetesi dengan aquades. Selanjutnya diletakkan pada media. Media kemudian diinkubasi selama 20-24 jam dengan suhu  $35-37^\circ\text{C}$ . Setelah 24 jam, lakukan pengamatan, daerah bening di sekitar cakram menggambarkan zona hambat. Diameter zona hambat yang telah diperoleh tersebut kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong (Cavalieri, 2005). Diameter zona hambat tersebut diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan mm. Pengukuran dilakukan menggunakan metode random, yaitu dengan memberi kode pada zona hambat yang terbentuk tanpa diketahui konsentrasinya dan dilakukan oleh 2 orang pengamat untuk menghindari terjadinya bias.

### 3.9 Parameter yang Diukur

Parameter yang diukur adalah diameter zona terang pada media yang menandakan terjadinya penghambatan terhadap pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* dalam satuan millimeter (mm) dengan menggunakan jangka sorong.

### 3.10 Interpretasi Efek Kombinasi

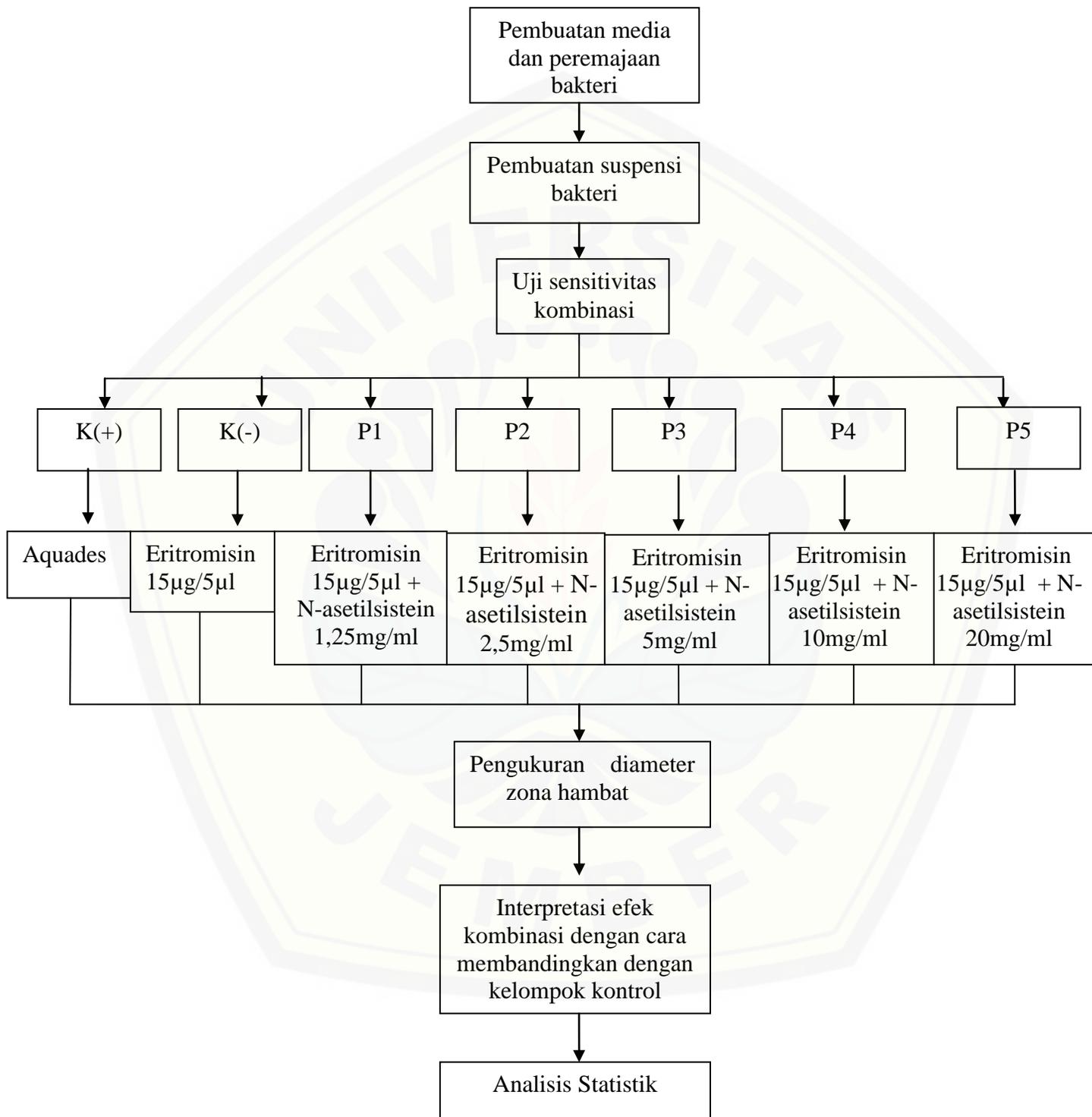
Interpretasi efek kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein dilakukan dengan cara membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif. Setelah dilakukan pengukuran diameter menggunakan jangka sorong, bila didapatkan

kelompok perlakuan memiliki diameter zona hambat yang lebih lebar dibanding kelompok kontrol positif berarti menandakan bahwa N-asetilsistein meningkatkan kerja antibiotik. Sebaliknya bila diameter zona hambat kelompok perlakuan lebih sempit, berarti menandakan bahwa N-asetilsistein menghambat kerja antibiotik dalam membunuh bakteri.

### 3.11 Analisis Data

Data penelitian diperoleh dari pengukuran diameter zona hambat pada media. Analisis data dilakukan dengan menggunakan beberapa uji analisis. Pertama dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Selanjutnya untuk mengetahui efek pemberian kombinasi eritromisin dan N-asetilsistein dengan konsentrasi bertingkat terhadap pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* digunakan uji korelasi Pearson. Analisis data dilanjutkan menggunakan uji Regresi Logaritmik untuk mengetahui konsentrasi terkecil yang mampu mempengaruhi pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* (Dahlan, 2009).

## 3.12 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur Penelitian