



**EFEK KOMBINASI N-ASETILSISTEIN DAN CIPROFLOXACIN
TERHADAP PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Farmitalia Nisa Trisianti
NIM 122010101037**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**EFEK KOMBINASI N-ASETILSISTEIN DAN CIPROFLOXACIN
TERHADAP PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

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

Oleh

**Farmitalia Nisa Trisianti
NIM 122010101037**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dengan seluruh rahmat serta kasih sayang-Nya yang membuat saya tidak bisa berhenti mengucap syukur, atas ridho dan amanah-Nya sehingga saya berkesempatan untuk belajar ilmu yang luar biasa ini;
2. Kedua orang tua tercinta, Bapak Jugi Tristiano dan Mama Rahayu, yang tak pernah lelah memberikan doa, bimbingan, dukungan, kasih sayang, serta pengorbanan yang tiada terhingga sehingga saya sampai pada tahap ini;
3. Guru – guru yang telah membagi ilmu dan mendidik dengan penuh kesabaran sehingga saya mampu menjadi manusia yang berilmu, bertakwa, dan bermanfaat bagi sekitar;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas seluruh kesempatan menimba ilmu dan pengalaman yang berharga ini.

MOTO



... Tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.*)
Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya... **)
Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan***)

*) Surat Al-Baqarah: 216. Al-Qur'anul Karim

**) Surat Al-Baqarah: 286. Al-Qur'anul Karim

***) Surat Al-Insyirah: 5. Al-Qur'anul Karim

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Farmitalia Nisa Trisianti

NIM : 122010101037

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi N-asetilsistein dan Ciprofloxacin terhadap Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 31 Desember 2015

Yang menyatakan,

Farmitalia Nisa Trisianti

NIM 122010101037

SKRIPSI

EFEK KOMBINASI N-ASETILSISTEIN DAN CIPROFLOXACIN

TERHADAP PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa*

SECARA *IN VITRO*

Oleh

Farmitalia Nisa Trisianti

NIM 122010101037

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Septa Surya Wahyudi, Sp.U

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Kombinasi N-asetilsistein dan Ciprofloxacin terhadap Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis , 31 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji;

Penguji I,

Penguji II,

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

dr. Sugiyanta, M.Ked
NIP. 19790207 200501 1 001

Penguji III,

Penguji IV,

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

dr. Septa Surya Wahyudi, Sp.U
NIP. 19780922 200501 1 002

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Efek Kombinasi N-asetilsistein dan Ciprofloxacin terhadap Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*; Farmitalia Nisa Trisianti; 122010101037; 2015; 49 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan berbagai macam infeksi antara lain infeksi kulit, infeksi pada selaput otak, infeksi saluran kencing, infeksi saluran pernafasan seperti fibrosis kistik, dan lain-lain. Pengobatan infeksi akibat *Pseudomonas aeruginosa* salah satunya dapat menggunakan golongan fluoroquinolon yakni ciprofloxacin. Obat ini berspektrum luas dan memblok sintesis DNA bakteri sehingga dapat mencegah proses transkripsi dan replikasi bakteri. Namun pada beberapa kasus didapatkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* mulai resisten terhadap banyak agen antimikrobal setelah pemberian terapi antibiotik inisial atau terapi jangka panjang.

Pengobatan infeksi akibat *Pseudomonas aeruginosa* tidak jarang menggunakan lebih dari satu obat untuk mencegah terjadinya resistensi. Salah satu obat yang sering dikombinasikan dengan ciprofloxacin yakni N-asetilsistein. N-asetilsistein merupakan obat non antibiotik yang memiliki sifat antibakterial terhadap bakteri gram positif ataupun negatif. Sifat antibakterial pada N-asetilsistein (NAC) mampu mengurangi pembentukan biofilm berbagai macam bakteri dan mereduksi produksi matriks ekstraseluler polisakarida. Oleh karena itu peneliti ingin mengetahui efek kombinasi N-asetilsistein dan ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

Penelitian ini dilakukan secara *quasi eksperimental laboratories* dengan rancangan *post test only control group design* dan menggunakan metode *disc diffusion*. Sampel yang digunakan merupakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dibagi dalam 7 kelompok yaitu 5 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol (negatif dan

positif). Kelompok kontrol negatif berisi akuades, kontrol positif berisi antibiotik ciprofloxacin 1mg/ml, dan kelompok perlakuan berisi N-asetilsistein konsentrasi 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, dan 20mg/ml kombinasi dengan ciprofloxacin konsentrasi tetap 1mg/ml. Cawan yang berisi kelompok penelitian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-20 jam kemudian diukur diameter zona terang pada media menggunakan jangka sorong. Setelah itu hasil penelitian di analisis statistik.

Pada penelitian ini didapatkan rerata diameter zona hambat pada kelompok kontrol negatif 6 mm (ukuran cakram disk), kontrol positif sebesar 26,56 mm, perlakuan I konsentrasi 1,25mg/ml sebesar 24,33 mm, perlakuan II konsentrasi 2,5mg/ml sebesar 25,02 mm, perlakuan III konsentrasi 5mg/ml sebesar 26,02 mm, perlakuan IV konsentrasi 10mg/ml sebesar 26,76 mm, perlakuan V konsentrasi 20mg/ml sebesar 27,18 mm. Hasil uji normalitas didapatkan nilai $p > 0,05$ yang menunjukkan data terdistribusi normal. Pada uji *Levene's* didapatkan nilai 0,058 lebih dari 0,05 yang berarti data memiliki varian yang sama. Kemudian data dianalisis menggunakan korelasi Pearson didapatkan nilai signifikansi $< 0,01$ dan nilai koefisien sebesar 0,652 yang menunjukkan hubungan antar keduanya kuat. Lalu dilanjutkan dengan uji regresi logaritmik untuk mengetahui pengaruh variabel bebas (konsentrasi N-asetilsistein dalam kombinasi) terhadap variabel terikat (diameter zona hambat) didapatkan persamaan $Y = 24,134 + 1,073 \ln X$ dengan nilai *R Square* 0.409 atau sebesar 40.9%.

Penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh kombinasi N-asetilsistein dan ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dengan hasil melebihi kontrol positif secara kuantitatif ketika konsentrasi N-asetilsistein 9,593 mg/ml.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi N-asetilsistein dan Ciprofloxacin Terhadap Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* 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 terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Dini Agustina, M.Biomed, selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Septa Surya Wahjudi, Sp.U selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak membantu dan membimbing pengerjaan dan penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
3. dr. Cicih Komariah, Sp.M selaku dosen penguji I dan dr. Sugiyanta, M.Ked selaku dosen penguji II atas bimbingan dan masukannya;
4. Analis Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Mbak Lilis Lestari A.Md yang telah banyak membantu dalam penelitian ini dan selalu memberikan semangat dalam menyusun skripsi ini.
5. Kedua orangtua saya Bapak Jugi Trisianto dan Mama Rahayu, terima kasih atas segala kasih sayang, pengorbanan, semangat, nasihat, dan doa restu yang selalu tercurah untuk ananda;
6. Adikku Julian Rizki atas doa dan semangatnya untukku;
7. Teman-teman sekelompok seperjuangan skripsi (Kardiana Izza Ell Milla, Intan Palupi, Bagus Dwi Kurniawan), terimakasih atas bantuan, semangat, doa, dan kerjasamanya dari awal sampai akhir.

8. Sahabat-sahabatku (Sovira Maris Sabrina, Dzurrotul Athiyat, Samiyah, Rizka Nuzula Wardani, Galih Putri W, Devita Luthfia Fitrianasari, Novita Dwi Cahyani, Dear Farah Sielma), terima kasih atas segala bantuan, dukungan, semangat, dan doanya selama ini;
9. Kerabat satu kontrakan (Ongky Dyah Anggraini, Rosita Sopwi Nur Lailly, Kiki Andari) atas bantuan, semangat, dan doanya selama ini.
10. Teman senasib dan perjuangan skripsi (Dina Aprilianti) terima kasih atas segala bantuan, semangat, dan doanya.
11. Teman – teman angkatan 2012 *Panacea*, terima kasih atas segala bantuannya dan dukungannya selama ini;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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, 31 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Pertumbuhan dan Metabolisme Bakteri	7

2.1.4 Biofilm Bakteri	7
2.1.5 DNA Girase dan Topoisomerase IV Bakteri	10
2.1.6 Patogenitas	11
2.1.7 Pengobatan	11
2.2 Antimikroba	12
2.2.1 Prinsip Kerja Obat Antimikroba	12
2.2.2 Resistensi Obat Antimikroba	14
2.3 Ciprofloxacin	14
2.3.1 Struktur Kimia	15
2.3.2 Mekanisme Aksi	15
2.3.3 Farmakokinetik	16
2.4 N-Asetilsistein.....	16
2.4.1 Struktur Kimia	17
2.4.2 Mekanisme Aksi	17
2.4.3 Farmakokinetik	18
2.5 Terapi Kombinasi N-asetilsistein dan Ciprofloxacin.....	18
2.5.1 Tujuan Kombinasi Obat	20
2.5.2 Interaksi Obat	21
2.6 Kerangka Konseptual Penelitian.....	23
2.7 Hipotesis Penelitian	24
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	25
3.1 Jenis Penelitian.....	25
3.2 Rancangan Penelitian.....	25
3.3 Sampel Penelitian.....	27
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
3.5 Variabel Penelitian	27
3.5.1 Variabel Bebas.....	27
3.5.2 Variabel Terikat.....	27
3.5.3 Variabel Kendali.....	28

3.6 Definisi Operasional	28
3.7 Alat dan Bahan	29
3.7.1 Alat.....	29
3.7.2 Bahan.....	29
3.8 Prosedur Kerja	29
3.8.1 Persiapan Alat	29
3.8.2 Pembuatan Media	30
3.8.3 Pemeliharaan Bakteri	30
3.8.4 Pembuatan Larutan <i>Mc Farland</i>	30
3.8.5 Penyiapan Suspensi Bakteri.....	30
3.8.6 Persiapan Uji <i>Disc Diffusion</i>	30
3.8.7 Pembuatan <i>Stock Solution</i> Ciprofloxacin dan NAC	31
3.8.8 Uji Kombinasi Ciprofloxacin dan N-asetilsistein	31
3.9 Parameter yang Diuji	32
3.10 Interpretasi Efek Kombinasi	32
3.11 Analisis Data	32
3.12 Skema Pelaksanaan Penelitian	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Hasil Penelitian	34
4.1.1 Tempat, Waktu, dan Sampel Penelitian	34
4.1.2 Hasil Uji Kepekaan	34
4.2 Analisis Data	37
4.3 Pembahasan	39
BAB 5. PENUTUP	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Taksonomi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
Tabel 2.2 Interaksi Obat dengan Ciprofloxacin	21
Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat	35
Tabel 4.2 Hasil Uji <i>Shapiro-Wilk</i>	37
Tabel 4.3 Hasil Uji Korelasi Pearson.....	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Gambar 2.2 Proses Pembentukan Biofilm	8
Gambar 2.3 Struktur Kimia Ciprofloxacin	15
Gambar 2.4 Target Interaksi Obat	16
Gambar 2.5 Struktur Kimia N-asetilsistein.....	17
Gambar 2.6 Skema Kerangka Konseptual Penelitian	23
Gambar 3.1 Rancangan Penelitian.....	26
Gambar 3.2 Pengukuran Diameter Zona Hambat.....	29
Gambar 3.3 Skema Pelaksanaan Penelitian	33
Gambar 4.1 Zona Hambat Berbagai Tingkat Konsentrasi	36
Gambar 4.2 Diagram batang rata – rata diameter zona hambat	36
Gambar 4.3 Titik – titik sebaran data	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Persetujuan Etik Penelitian	50
Lampiran B. Hasil Uji Normalitas Shapiro-Wilk	52
Lampiran C. Hasil Uji Homogenitas Levene	53
Lampiran D. Hasil Uji Korelasi Pearson	54
Lampiran E. Hasil Uji Regresi Logaritmik	55
Lampiran F. Gambar Penelitian	57

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar tidak hanya di Indonesia, namun juga di seluruh dunia. Selain virus sebagai penyebabnya, bakteri juga tidak kalah pentingnya dalam menyebabkan penyakit infeksi dan merupakan penyebab utama kematian di dunia (Mardiastuti *et al.*, 2007). Menurut penelitian yang dilakukan RSUD Abdul Moeloek Lampung pada tahun 2010, didapatkan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp.*, dan *Escherichia coli* merupakan lima isolat bakteri aerob penyebab terbanyak infeksi luka operasi yang juga merupakan bakteri umum penyebab infeksi nosokomial yang terjadi di rumah sakit (Samuel dan Warganegara, 2012). Dari semua infeksi nosokomial dilaporkan sebesar 13,2%-22.6% isolat *Pseudomonas aeruginosa* merupakan penyebab utama infeksi (Driscoll *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang bersifat invasif, toksigenik, terdapat dalam flora normal usus dan kulit manusia dalam jumlah kecil serta merupakan patogen utama dari kelompoknya. *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan bermacam infeksi antara infeksi kulit, infeksi selaput otak, infeksi saluran kencing, menginfeksi pasien dengan imun lemah, dan lain lain (Brooks *et al.*, 2013). Salah satu penyakit yang sering disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* yakni fibrosis kistik yang menyerang sistem sinopulmonari pada pasien. Pada tahun 2004 oleh *US Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry* dilaporkan 57,3% kultur respiratori pasien fibrosis kistik mengandung *Pseudomonas aeruginosa* dan 97,5% diantaranya ditemukan terinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada usia 3 tahun. Pada keadaan kronis, bakteri yang terdapat pada pasien fibrosis kistik dapat lebih dari satu strain genotip serta menghasilkan biofilm mukoid yang memproduksi alginat sehingga mampu memproteksi bakteri dari lingkungan luar termasuk penetrasi oleh obat antimikrobal (Driscoll *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa resisten terhadap banyak agen antimikrobia dan penatalaksanaan *Pseudomonas aeruginosa* tidak hanya menggunakan pengobatan tunggal dikarenakan tingkat keberhasilan terapinya rendah. Hal tersebut dikarenakan *Pseudomonas aeruginosa* memiliki kemampuan untuk cepat berkembang menjadi resisten terhadap berbagai macam kelas antibiotik (Lister *et al.*, 2009). Salah satu obat aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* yakni golongan fluoroquinolon (Brooks *et al.*, 2013). Fluoroquinolon merupakan obat spektrum luas dan bekerja dengan memblokir sintesis DNA bakteri sehingga dapat mencegah proses transkripsi dan replikasi bakteri (Katzung *et al.*, 2012). Salah satu contoh obat dari golongan ini adalah ciprofloxacin yang mampu menembus biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dengan cepat sedangkan aminoglikosida, seperti tobramisin dan gentamisin bekerja lebih lambat (Walters III *et al.*, 2003).

Namun berdasarkan data dari *US National Surveillance* pada tahun 2001 hingga 2006 dilaporkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap antibiotik cefepime 27%-29%, imipenem 30-31%, meropenem 23%, dan juga ciprofloxacin sebesar 41%-44% (Lister *et al.*, 2009). Oleh karena itu diperlukan usaha untuk mengurangi resistensi salah satunya menggunakan kombinasi obat. Pengobatan *Pseudomonas aeruginosa* tidak jarang menggunakan lebih dari satu obat. Salah satu contoh obat yang sering kali dikombinasikan dengan antibiotik ciprofloxacin adalah N-asetilsistein (NAC). N-asetilsistein memiliki efek penghambatan pada produksi biofilm dan memiliki kemampuan untuk mengeradikasi pembentukan awal (*pre-formed*) biofilm (El-Feky *et al.*, 2009). Kombinasi kedua obat tersebut dapat memungkinkan bahwa kombinasi agen antibiofilm dan antimikrobia akan menjadi sinergis (Olofsson *et al.*, 2003).

N-asetilsistein dipertimbangkan sebagai obat non antibiotik yang memiliki sifat antibakterial yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif termasuk *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Enterobacter*. Sifat antibakterial pada N-asetilsistein karena mampu mengurangi pembentukan biofilm berbagai macam bakteri dan mereduksi produksi

matriks ekstraseluler polisakarida, selain itu N-asetilsistein juga berfungsi sebagai agen mukolitik (Zhao, 2010).

Pada penelitian Goswami pada tahun 2011 telah dilakukan studi tentang kombinasi N-asetilsistein dan ciprofloxacin terhadap bakteri *Escherichia coli* namun terjadi penurunan kepekaan pada bakteri sedangkan pada penelitian El-Feky tahun 2009 dan Zhao tahun 2010 menyatakan bahwa kombinasi N-asetilsistein dapat meningkatkan efektivitas terapeutik dari ciprofloxacin. Berdasarkan uraian tersebut, peneliti ingin mengetahui efek kombinasi dari N-asetilsistein dan ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dirumuskan berdasarkan latar belakang di atas sebagai berikut.

1. Bagaimana efek kombinasi N-asetilsistein dan ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* ?
2. Berapakah konsentrasi minimal N-asetilsistein dalam kombinasi yang dapat mempengaruhi kepekaan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap ciprofloxacin?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini sebagai berikut.

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek kombinasi N-asetilsistein dan ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui konsentrasi minimal N-asetilsistein dalam kombinasi yang dapat mempengaruhi kepekaan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap ciprofloxacin.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Menjadi bahan masukan atau informasi yang bermanfaat bagi institusi pendidikan tentang efek dari kombinasi obat N-asetilsistein dan ciprofloxacin terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Memberikan manfaat keilmuan dalam menambah khazanah pengembangan ilmu pengetahuan terapan terutama dalam kombinasi obat.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

1. Menjadi dasar pedoman terapi terbaru untuk mengatasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan sebagai data dasar pengembangan terapi antibakteri *Pseudomonas*.
2. Kedepan dapat menjadi penelitian lebih lanjut serta sebagai tambahan pustaka.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan kelompok bakteri yang tersebar luas di tanah dan air. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang bersifat invasif, toksigenik, dan terdapat dalam flora normal usus dan kulit manusia dalam jumlah kecil serta merupakan patogen utama dari kelompoknya. Bakteri ini dapat menginfeksi pasien dengan pertahanan tubuh yang rendah dan merupakan penyebab infeksi nosokomial (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan taksonomi binomial nomenklatur dapat dilihat pada Tabel 2.1 di bawah ini

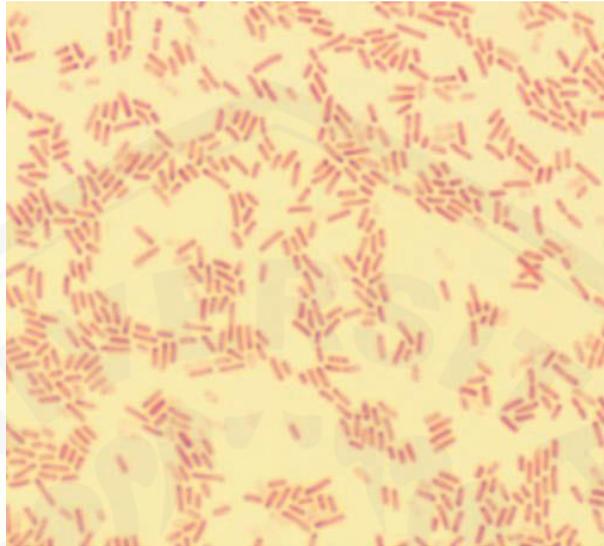
Tabel 2.1 Taksonomi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Taksonomi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Proteobacteria
Ordo	Pseudomonadales
Family	Pseudomonadaceae
Genus	<i>Pseudomonas</i>
Species	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Sumber: Brenner *et al.*, 2007

2.1.2 Morfologi

Pseudomonas aeruginosa dengan ciri khasnya berbentuk batang, motil, dan berukuran sekitar 0,6 x 2 μm . Bakteri ini tergolong kelompok bakteri gram negatif dan dapat muncul dalam bentuk tunggal, berpasangan, atau kadang-kadang dalam bentuk rantai pendek (Brooks *et al.*, 2013). Morfologi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* dengan pewarnaan gram dilihat dibawah mikroskop pembesaran 1000x (Brooks *et al.*, 2013)

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri obligat aerob yang dapat tumbuh dengan mudah pada banyak jenis medium biakan dan beberapa strain dapat menyebabkan hemolisis darah. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* adalah bulat halus dengan warna fluoresens kehijauan. Bakteri ini menghasilkan pigmen kebiruan piosianin yang tidak berfluorensi, yang berdifusi ke dalam agar. Spesies *Pseudomonas* lainnya tidak menghasilkan piosianin. Banyak strain *Pseudomonas aeruginosa* yang memproduksi pigmen berfluorosensi pioverdin, yang memberikan warna kehijauan pada agar. Beberapa strain memproduksi warna pigmen merah gelap piorubin atau pigmen hitam piomelanin (Brooks *et al.*, 2013).

Pseudomonas aeruginosa pada biakan dapat membentuk berbagai jenis koloni. Setiap koloni dapat memiliki aktivitas biokimia, enzimatik, dan pola kerentanan antimikroba yang berbeda. Pada biakan pasien dengan fibrosis kistik sering membentuk koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang mukoid akibat produksi berlebihan dari alginate, satu eksopolisakarida yang berfungsi menghasilkan matriks sehingga organisme dapat hidup dalam biofilm (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.3 Pertumbuhan dan Metabolisme Bakteri

Pseudomonas aeruginosa tumbuh dengan baik pada suhu 37-42°C bakteri ini tidak memfermentasi karbohidrat dan bersifat oksidasi positif, tetapi banyak strain mengoksidasi glukosa. Identifikasi bakteri ini didasarkan pada morfologi koloni, oksidasi positifnya, adanya pigmen yang khas berwarna biru kehijauan, dan pertumbuhan pada suhu 42°C (Brooks *et al.*, 2013).

Struktur dari permukaan sel yang menjulur pil (fimbria) membantu perlekatan pada sel epitel inang. Lipopolisakarida yang ada dalam berbagai imunitipe bertanggung jawab terhadap sifat endotoksik *Pseudomonas aeruginosa*. Jenis-jenis bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dibedakan berdasarkan kerentanannya terhadap piosin (bakteriosin) dan imunitipe lipopolisakarida. Kebanyakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diambil dari infeksi klinis menghasilkan enzim ekstraseluler, termasuk elastase, protease, dan hemolisin (fosfolipase C dan glikolipid) (Brooks *et al.*, 2013).

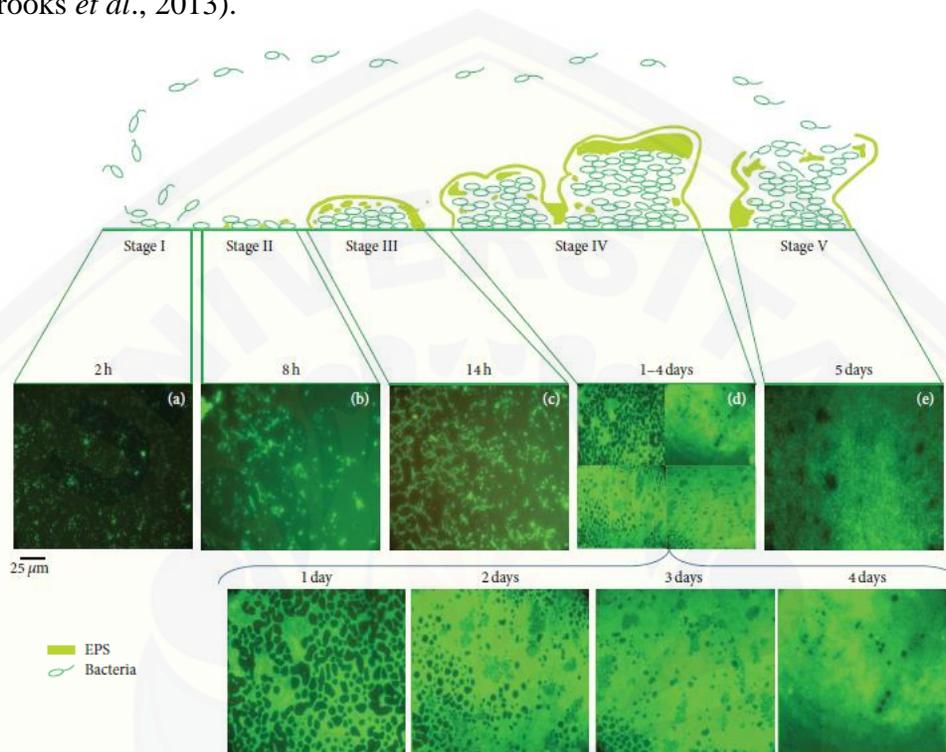
Pseudomonas aeruginosa memproduksi eksotoksin A yang menyebabkan nekrosis jaringan dan bersifat letal untuk binatang. Mekanisme toksin *Pseudomonas aeruginosa* serupa dengan mekanisme toksin difteri dengan cara menghambat sintesis protein, walaupun struktur kedua toksin tersebut berbeda. Pada beberapa pasien yang telah sembuh dari infeksi berat *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi antitoksin yang mampu melawan eksotoksin A bakteri (Brooks *et al.*, 2013).

Pseudomonas aeruginosa dapat tumbuh pada berbagai media karena kebutuhan nutrisinya sangat sederhana. Bakteri ini tidak meragikan laktosa dan mudah dibedakan dari bakteri peragi laktosa. Kultur pembiakan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan tes spesifik dari diagnosis infeksi *Pseudomonas aeruginosa* (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4 Biofilm Bakteri

Biofilm adalah kumpulan bakteri yang saling melekat pada permukaan padat dan dibungkus dalam matriks eksopolisakarida. Sedangkan bakteri planktonik (bakteri yang hidup bebas) dapat tumbuh tanpa ada interaksi mikroorganisme. Biofilm

terbentuk dari selapis lapisan berlendir dan terdapat di seluruh alam. Satu spesies bakteri atau lebih dapat terlibat dan saling berkumpul untuk membentuk biofilm (Brooks *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Proses pembentukan biofilm bakteri dilihat menggunakan mikroskop fluorosens dengan 400x pembesaran (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

Bakteri dalam matriks eksopolisakarida dapat terlindungi dari mekanisme imun inang. Matriks ini juga berfungsi sebagai proteksi bakteri terhadap beberapa antimikrobal. Dari mekanisme biofilm inilah yang menjelaskan mengapa infeksi yang disebabkan oleh biofilm sulit diobati (Brooks *et al.*, 2013).

Pembentukan biofilm pertama adalah kolonisasi permukaan. Kolonisasi bermula apabila bakteri berada di atas permukaan dan menggunakan flagel untuk bergerak. Penambahan mekanisme motilitas oleh fli juga dapat digunakan beberapa bakteri untuk menarik diri bersama – sama menjadi satu kelompok sedangkan lainnya bergantung pada pembelahan sel untuk memulai pembentukan koloni. Seterusnya bakteri menyekresikan suatu sinyal kimia antar sel, proses ini dinamakan *quorum*

sensing (Brooks, *et al.*, 2013). Molekul sinyal ini berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan dalam koordinasi aktivitas biofilm (Gunardi, 2014). Pembentukan biofilm oleh *Pseudomonas aeruginosa* diatur oleh mekanisme komunikasi dari sel ke sel yang dikenal sebagai *quorum sensing* yang terdiri dari *las* dan *rhl*. (Karatuna dan Yagci, 2010). *Quorum sensing* ini melibatkan produksi, sekresi, dan deteksi molekul bernama *autoinducer* (AIs) untuk mengatur perilaku dari populasi bakteri (Wei dan Ma, 2013).

Biofilm terutama terdiri dari materi matriks (85% dari volume) dan kumpulan sel – sel bakteri (15% dari volume). *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) mungkin menyusun 50% - 90% karbon organik biofilm dan dapat dianggap sebagai material matriks yang utama. EPS bervariasi secara fisik dan kimia, tapi terutama terdiri dari polisakarida. EPS bersifat hidrofilik karena dapat mengikat air dalam jumlah yang banyak, dengan tingkat kelarutan yang berbeda – beda (Gunardi, 2014).

Pembentukan biofilm merupakan siklus tiada henti yang mengatur kumpulan bakteri yang terbungkus pada matriks *extracellular polymeric substance* (EPS) pada satu permukaan. EPS terdiri dari sebagian besar biomolekul, eksopolisakarida, ekstraseluler DNA (eDNA), dan polipeptida. *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi setidaknya tiga polisakarida (alginat, Pel, dan Psl) yang menentukan ketahanan struktur biofilm. Alginat berfungsi sebagai penyimpanan air dan nutrisi. Pel polisakarida sebagian besar merupakan bahan matriks yang kaya glukosa. Psl terdiri dari pentasakarida berulang. Pel dan Psl dapat berfungsi sebagai struktur sementara untuk pengembangan biofilm dan terlibat pada proses awal pembentukan biofilm. eDNA memainkan peran penting pada biofilm sebagai senyawa penghubung antar sel. Pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* yang diamati menggunakan mikroskop fluoresens pembesaran 400x terjadi mulai 14 jam pertama pembentukan mikrokoloni. Kemudian pematangan biofilm dan pertumbuhan bakteri terjadi pada 1-4 hari (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

2.1.5 DNA Girase dan Topoisomerase IV Bakteri

DNA topoisomerase bakteri berperan dalam replikasi dan transkripsi DNA. Empat macam DNA topoisomerase yakni topoisomerase I, topoisomerase II atau DNA girase, topoisomerase III, dan topoisomerase IV. DNA girase dan topoisomerase IV diklasifikasikan sebagai tipe II topoisomerase dikarenakan kesamaan sekuen asam amino dan mekanisme enzimatisnya. Mekanisme enzim ini melibatkan pembelahan dan penguntaian kembali DNA. Keunikan DNA girase diantara topoisomerase lainnya yakni kemampuan untuk memulai pemilinan kumparan negatif heliks menjadi molekul DNA. DNA girase merupakan heterotetramer yang terdiri dari dua subunit *gyrA* dan *gyrB*. *GyrA* berperan untuk pengikatan ikatan DNA, pembelahan, penggabungan sedangkan *gyrB* berperan untuk aktivitas ATPase (Akasaka *et al.*, 1999).

Topoisomerase IV merupakan tipe II DNA topoisomerase yang berperan dalam relaksasi superheliks DNA dan perbedaannya dengan DNA girase yakni topoisomerase IV tidak memiliki kemampuan aktivitas pemilinan kumparan. Topoisomerase II merupakan target utama dari obat-obatan karena memiliki target penting untuk dua kelas agen antimikrobal dimana subunit A (*gyrA*) sebagai target perlekatan kuinolon sedangkan subunit B (*gyrB*) sebagai target koumarin (Akasaka *et al.*, 1999).

Pada *Pseudomonas aeruginosa* terjadinya mekanisme resistensi bakteri salah satunya karena modifikasi tempat target dari DNA girase dan topoisomerase IV. Perubahan pada DNA girase atau topoisomerase IV disebabkan mutasi oleh lokasi perlekatan kuinolon pada *gyrA*. Topoisomerase IV tidak seberapa kuinolon resisten pada *Pseudomonas aeruginosa* (Akasaka *et al.*, 1999).

Penelitian Akasaka tahun 1999 membandingkan empat macam topoisomerase terhadap antimikrobal dan didapatkan hasil bahwa aktivitas pemilinan kumparan DNA girase lebih sensitif terhadap kuinolon daripada aktivitas topoisomerase IV. DNA girase merupakan target primer dari kuinolon baru sedangkan topoisomerase IV bertindak sebagai target sekunder kuinolon terhadap kepekaan *Pseudomonas aeruginosa* (Akasaka *et al.*, 1999).

2.1.6 Patogenitas

Pseudomonas aeruginosa hanya bersifat patogen ketika kontak dengan area tanpa pertahanan normal, seperti ketika selaput lendir dan jaringan kulit terluka dikarenakan luka bakar, ketika intravena atau kateter digunakan, atau ketika terjadi neutropenia. Bakteri melekat dan berkoloni pada selaput lendir atau kulit, menyerang secara lokal dan mengakibatkan penyakit sistemik. Proses infeksi ini melibatkan fili, enzim, dan toksiknya. Lipopolisakarida secara langsung memegang peranan penting penyebab demam, syok, oliguria, leukositosis, leukopenia, sindrom respirasi distres (Brooks *et al.*, 2013).

Lipopolisakarida (LPS) *Pseudomonas aeruginosa* memiliki sinyal melalui tiga bagian reseptor yakni lipid A yang diketahui sebagai endotoksin yang berinteraksi dengan reseptor sel inang untuk memulai respon inflamasi. Selain itu inti oligosakarida berinteraksi dengan CFTR pada sel epitel yang mengarahkan imun resisten terhadap patogen. Sedangkan rantai antigen O pada bakteri berperan terhadap pertahanan serum normal manusia, detergen, dan beberapa antibiotik (Fujitani *et al.*, 2011).

2.1.7 Pengobatan

Pengobatan infeksi karena *Pseudomonas aeruginosa* tidak menggunakan pengobatan tunggal dikarenakan keberhasilan terapinya rendah dan bakteri dengan cepat berkembang menjadi resisten. Penisilin spektrum luas seperti piperacillin aktif melawan *Pseudomonas aeruginosa* jika digunakan kombinasi dengan aminoglikosida yakni tobramycin. Obat lainnya yang aktif melawan *Pseudomonas aeruginosa* termasuk aztreonam, golongan carbapenem seperti imipenem atau meropenem, dan golongan fluoroquinolon seperti ciprofloxacin (Brooks *et al.*, 2013).

Sefalosporin, ceftazidime, cefoperazone, dan cefepime aktif melawan bakteri ini. Ceftazidime sering digunakan dengan aminoglikosida pada terapi primer infeksi *Pseudomonas aeruginosa* terutama pada pasien dengan neutropenia. Uji kepekaan obat antimikroba harus dilakukan sebagai penunjang dalam memilih terapi (Brooks *et al.*, 2013).

2.2 Antimikroba

Antimikroba dapat dibedakan menjadi agen antibakteri, antifungal, dan antiviral. Agen ini terdiri dari komponen alami (antibiotik) dan komponen sintetis yang dihasilkan di laboratorium. Antibiotik merupakan sejenis substansi yang dihasilkan oleh satu mikroba dan menghambat pertumbuhan dan viabilitas mikroba lain (Brenner dan Stevens, 2010).

2.2.1 Prinsip Kerja Obat Antimikroba

Toksitas selektif merupakan agen antimikrobal ideal yang berarti obat tersebut berbahaya pada patogen tanpa membahayakan sel inang. Sifat toksitas selektif itu relatif yang berarti obat dalam satu konsentrasi tertentu dapat ditoleransi oleh inang dan dapat merusak mikroorganisme penyebab infeksi (Brooks *et al.*, 2013).

Toksitas selektif dapat berfungsi sebagai reseptor spesifik yang dibutuhkan untuk perlekatan obat, atau dapat bergantung pada inhibisi proses biokimia yang penting bagi patogen namun tidak bagi inang. Mekanisme aksi dari obat antimikrobal dapat dibagi menjadi empat cara yakni (Brooks *et al.*, 2013):

1. Inhibisi Sintesis Dinding Sel

Dinding sel bakteri mengandung polimer kompleks peptidoglikan yang terdiri dari polisakarida dan polipeptida dengan banyak hubungan silang. Lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri gram positif lebih tebal daripada bakteri gram negatif.

Dinding sel berfungsi mempertahankan bentuk dan ukuran mikroorganisme, yang mempunyai tekanan osmotik internal tinggi. Kerusakan pada dinding sel seperti akibat terkena enzim lisozim atau inhibisi pada pembentukan dinding sel dapat menyebabkan sel menjadi lisis.

Obat golongan β -laktam merupakan inhibitor selektif untuk sintesis dinding sel bakteri dan aktif melawan pertumbuhan bakteri. Contoh agen yang

bekerja dengan inhibisi sintesis dinding sel ialah penisilin, sefalosporin, vankomisin, ristocetin, dan novobiocin.

2. Inhibisi Fungsi Membran Sel

Semua sitoplasma sel hidup diikat oleh membran sitoplasma yang berperan sebagai barrier permeabilitas selektif dan berfungsi sebagai transpor aktif untuk mengontrol komposisi di dalam sel. Jika fungsi membran sitoplasma ini terganggu dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel karena makromolekul dan ion keluar dari sel. Obat – obatan yang bekerja dengan cara inhibisi fungsi membran sel adalah polimiksin, amfoterisin B, kolistin, dan imidazol serta triazol.

3. Inhibisi Sintesis Protein (Inhibisi Translasi dan Transkripsi Bahan Genetik)

Ribosom berperan sebagai tempat sintesis protein bakteri. Bakteri memiliki ribosom 70s sedangkan pada sel mamalia memiliki ribosom 80s. Hal ini menjelaskan mengapa obat antimikrobia mampu menghambat sintesis protein pada ribosom 70s bakteri tanpa menimbulkan efek samping pada ribosom mamalia.

Obat-obatan yang bekerja dengan cara inhibisi sintesis protein adalah eritromisin, linkomisin, tetrasiklin, aminoglikosida, dan kloramfenikol.

4. Inhibisi Sintesis Asam Nukleat

Obat yang bekerja pada sintesis ini ialah kuinolon, pirimetamin, rifampin, sulfonamida, trimetoprim, dan trimetrexat. Rifampin menghambat pertumbuhan bakteri dengan berikatan kuat pada RNA polimerase dependen-DNA bakteri. Obat golongan kuinolon dan fluorokuinolon menghambat sintesis DNA mikroba dengan menghambat DNA girase.

Mikroorganisme mempunyai asam p-aminobenzoat (PABA) yang merupakan metabolit penting dalam sintesis asam folat, cara kerja spesifik PABA berupa kondensasi satu pteridin yang bergantung adenosine trifosfat (ATP) dengan PABA untuk menghasilkan asam dihidropteroat, yang kemudian

diubah menjadi asam folat. Asam folat merupakan satu prekursor penting dalam sintesis asam nukleat. Sulfonamida merupakan analog struktural PABA dan menghambat dihidropteroat sintetase. Sulfonamida dapat masuk ke dalam reaksi PABA dan bersaing untuk pusat aktif enzim sehingga analog asam folat non fungsional terbentuk mencegah pertumbuhan sel bakteri lebih lanjut (Brooks *et al.*, 2013).

2.2.2 Resistensi Obat Antimikroba

Mekanisme resistensi bakteri terhadap obat antimikroba bisa melalui beberapa cara yakni (Brooks *et al.*, 2013) :

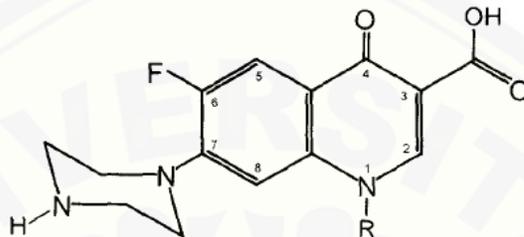
1. Mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat menghancurkan obat aktif. *Staphylococci* dan bakteri batang gram negatif lain yang resisten terhadap penisilin G menghasilkan sejenis enzim β -laktamase yang menginaktivasi obat tersebut.
2. Mikroorganisme mampu mengubah permeabilitas sel membrannya terhadap obat yang mengganggu transport aktif ke dalam sel.
3. Mikroorganisme dapat mengubah struktur sasaran atau reseptor untuk obat. Organisme resisten eritromisin telah mengubah reseptor pada ribosom subunit 50S yang merupakan tempat perlekatan obat eritromisin.
4. Mikroorganisme mampu mengubah jalur metabolik yang dilalui obat untuk reaksi penghambatan. Pada bakteri resisten sulfonamid tidak membutuhkan ekstraseluler PABA yang merupakan metabolit penting, namun menggunakan asam folat yang telah terbentuk.
5. Mikroorganisme mampu mengubah enzim yang dapat melakukan fungsi metaboliknya sehingga pengaruh ke obatnya kecil.

2.3 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin merupakan agen antiinfeksi spektrum luas dari kelas fluoroquinolon (Schuck, 2004). Ciprofloxacin sangat aktif secara *in vitro* melawan

bakteri gram negatif termasuk Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus* dan *Neisseria spp.* serta melawan stafilokokus dan beberapa bakteri gram positif lainnya (Turel *et al.*, 1997).

2.3.1 Struktur Kimia



Gambar 2.3 Struktur Kimia Ciprofloxacin (Turel *et al.*, 1997)

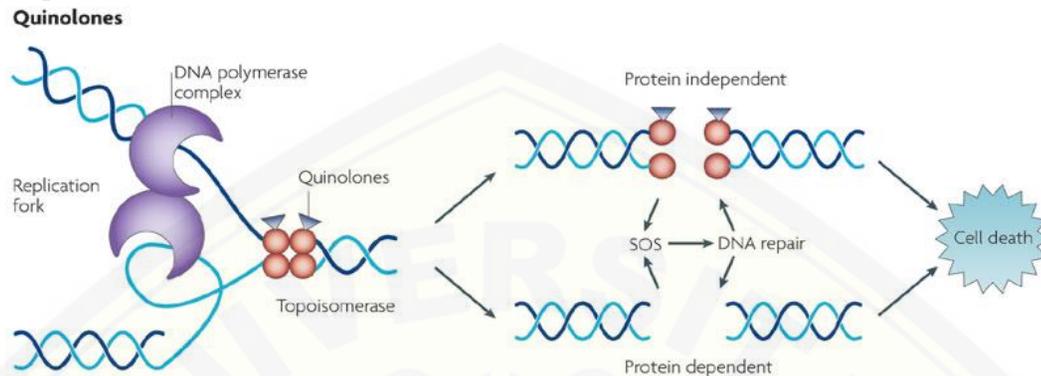
Ciprofloxacin merupakan antibiotik sintetik dari golongan fluoroquinolon yang berhubungan dengan asam nalidiksat. Secara kimiawi memiliki nama 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (Turel *et al.*, 1997). Struktur ciprofloxacin dapat dilihat pada Gambar 2.3.

2.3.2 Mekanisme Aksi

Golongan quinolon memblokir sintesis DNA bakteri dengan menghambat topoisomerase II (DNA gyrase) dan topoisomerase IV bakteri. Penghambatan DNA girase mencegah relaksasi dari pemilinan kumparan positif DNA yang dibutuhkan untuk transkripsi dan replikasi normal. Penghambatan topoisomerase IV berhubungan dengan pemisahan dari replikasi kromosom DNA pada pembelahan sel (Katzung, 2012).

Perusakan dari untai ganda DNA diikuti penghambatan topoisomerase oleh quinolon yang menimbulkan respons stres DNA (SOS respons), Rec A (protein penting untuk perbaikan dan pemeliharaan DNA) diaktivasi oleh DNA yang rusak dan mendorong pembelahan diri protein represor LexA yang menekan ekspresi respons gen SOS seperti enzim DNA *repair*. Hal tersebut mengarahkan pada perusakan untai

ganda DNA dan kematian sel baik secara sintesis protein dependen atau sintesis protein independen (Kohanski *et al.*, 2010).



Gambar 2.4 Target interaksi obat dan kaitannya dengan mekanisme kematian sel (Kohanski *et al.*, 2010)

2.3.3 Farmakokinetik

Ciprofloxacin memiliki bioavailabilitas sekitar 70% setelah pemberian secara oral. Maksimum konsentrasi plasma (C_{max}) antara 0.8 dan 3.9 mg/L dicapai 1 sampai 2 jam setelah pemberian oral dosis tunggal 250 sampai 750mg. Obat ini memiliki volume distribusi yang jelas besar (2,1 – 5 L/kg setelah pemberian oral atau intravena) dan dekonstruksi di banyak jaringan tubuh dan cairan, termasuk empedu, ginjal, hati, kantung empedu, prostat, dan jaringan paru.

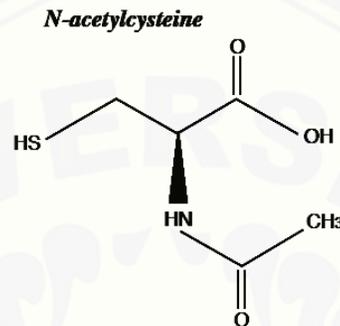
Ciprofloxacin keseluruhan diekskresi tanpa dimetabolisme di urin dan feses, meskipun sejumlah kecil metabolit terdeteksi. Waktu paruh ciprofloxacin sekitar 3 sampai 5 jam (Davis *et al.*, 1996).

2.4 N-Asetilsistein

N-asetilsistein telah digunakan sebagai agen mukolitik dalam penyakit kronik bronkitis dan penyakit pulmonari yang berkomplikasi dengan produksi mukus kental. N-asetilsistein juga digunakan sebagai antidot untuk hepatotoksik dikarenakan overdosis dari acetaminofen (Holdiness, 1991). Menurut studi pada hewan dan manusia, N-asetilsistein menunjukkan efek antioksidan kuat dan agen terapeutik

potensial dalam penanganan kanker, jantung, infeksi HIV, keracunan logam, dan penyakit lain yang disebabkan oleh kerusakan oksidatif (Thorne Research, 2002).

2.4.1 Struktur Kimia



Gambar 2.5 Struktur kimia N-asetilsistein (Thorne Research, 2002)

N-asetilsistein (NAC) merupakan derivat asam amino sistein dengan sebuah grup asetil yang melekat pada atom nitrogen dan seperti kebanyakan thiol (RSH) dapat dioksidasi oleh berbagai macam radikal dan juga sebagai nukleofili (donor pasangan elektron) (Samuni et al., 2013).

2.4.2 Mekanisme Aksi

N-asetilsistein efektif menurunkan sistein ekstraseluler dan menstimulasi sintesis glutathione, meningkatkan aktivitas glutathione-S-transferase, meningkatkan detoksifikasi liver dengan menghambat biotransformasi xenobiotik, dan merupakan nukleofili kuat yang mampu membersihkan radikal bebas (De Vries dan De Flora, 1993). N-asetilsistein efektif sebagai agen mukolitik yang dihasilkan dari grup sulfhidril berinteraksi dengan ikatan disulfida pada mukoprotein, dengan mukus kemudian dirusak menjadi lebih kecil, menjadi cairan yang tidak terlalu kental. Berperan juga sebagai ekspektoran dengan menstimulasi aksi silia dan gastro-pulmonari vagal refleks sehingga membersihkan mukus dari jalan nafas (Zimet I, 1998).

Sifat lain dari N-asetilsistein yakni mampu sebagai antimikrobal dengan cara mengurangi produksi matriks ekstraseluler polisakarida pada pembentukan awal (*pre-formed*) biofilm bakteri (El-Feky *et al.*, 2009). N-asetilsistein dipertimbangkan sebagai obat non antibiotik yang memiliki sifat antibakterial yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif termasuk *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Enterobacter* (Zhao, 2010).

2.4.3 Farmakokinetik

N-asetilsistein mengandung zat sulfihidril yang dengan cepat diserap oleh tubuh, diasetilasi dan dimetabolisme di usus dan hati. Metabolisme N-asetilsistein bergabung dengan protein dan peptide. Puncak level plasma N-asetilsistein sekitar satu jam dan tidak terdeteksi di plasma setelah 12 jam. Bioavailabilitasnya relatif rendah hanya 4-10 persen, namun pemberian N-asetilsistein secara klinis nampak efektif (Borgstrom *et al.*, 1986). Aktivitas biologikal N-asetilsistein berhubungan dengan grup sulfihidril dan memberikan proteksi terhadap proses oksidatif melalui gugus asetilnya (Thorne Research, 2002).

2.5 Terapi Kombinasi N-asetilsistein dan Ciprofloxacin

N-asetilsistein merupakan agen mukolitik (non bakterial) yang memiliki sifat antibakterial (Zhao, 2010). N-asetilsistein memiliki kemampuan untuk mengurangi atau menghambat aderens bakteri dan mengganggu pematangan biofilm (Pézer-Giraldo *et al.*, 1997). N-asetilsistein mampu mengurangi pembentukan biofilm oleh berbagai bakteri dan menurunkan produksi matriks ekstraseluler polisakarida (EPS) serta mengganggu biofilm matang (Pézer-Giraldo *et al.*, 1997). Karena kerentanan antimikroba terkait biofilm bakteri meningkat pada penggangguan biofilm (El-Azizi *et al.*, 2005). Enzim yang mendegradasi matriks ekstraseluler kemungkinan memegang peranan pada penghancuran biofilm dan dapat berguna sebagai agen antibiofilm. Gugus asetil pada N-acetyl-D-glucosamine-1-phosphate acetyl transferase merupakan

prekursor peptidoglikan dan lipopolisakarida pada patogen gram positif dan negatif yang mampu mengganggu matriks (Abdel-Aziz dan Aeron, 2014).

Ciprofloxacin yang merupakan golongan fluoroquinolon mampu menembus biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dengan cepat sedangkan aminoglikosida, seperti tobramisin dan gentamisin bekerja lebih lambat. Ciprofloxacin mampu menembus biofilm *Pseudomonas aeruginosa* namun gagal untuk membunuh bakteri. Ketebalan biofilm bakteri berhubungan dengan gradasi oksigen dan toleransi antibiotik dikarenakan keterbatasan oksigen yang membatasi aktivitas metabolik bakteri. Oksigen merupakan kebutuhan pada biofilm dan pada beberapa literatur menyebutkan bahwa kondisi anaerob mengantagoniskan aksi antibiotik melawan *Pseudomonas aeruginosa* (Walters III *et al.*, 2003).

Pada penelitian El-Feky tahun 2009 dilakukan pengamatan kombinasi ciprofloxacin dan N-asetilsistein pada berbagai bakteri seperti *Staphylococcus aerueus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Proteus vulgaris* menunjukkan efek penghambatan pada produksi biofilm (94-100%) dan efek penggangguan pada pembentukan awal biofilm (86-100%) dibandingkan dengan kontrol. N-asetilsistein (2 dan 4 mg/ml) mampu mengurangi sintesis biofilm sebesar 60% dan mengakibatkan pengurangan jumlah sel untuk pembentukan biofilm matang sebesar 62%. Kombinasi Ciprofloxacin/N-asetilsistein memiliki efek penghambatan pada produksi biofilm dan memiliki kemampuan untuk mengeradikasi pembentukan awal (*pre-formed*) biofilm (El-Feky *et al.*, 2009). Kemudian pada penelitian Zhao tahun 2010 dilakukan pengamatan kombinasi obat ciprofloxacin dan N-asetilsistein terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode dilusi dan didapatkan konsentrasi hambat minimum N-asetilsistein 10 mg/ml hingga 40 mg/ml mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri (Zhao, 2010). Hal tersebut dapat memungkinkan bahwa kombinasi agen antibiofilm/antimikrobal akan menjadi sinergis (Olofsson *et al.*, 2003).

2.5.1 Tujuan Kombinasi Obat

Pemilihan terapi kombinasi perlu hati – hati kemungkinan terjadinya interaksi obat dan peningkatan toksisitas obat. Tujuan terapi kombinasi antibiotik antara lain sebagai terapi empiris terhadap infeksi yang belum jelas kuman penyebabnya, untuk infeksi kuman multipel, untuk meningkatkan aktivitas antimikroba (efek sinergisme obat), dan untuk mencegah munculnya resistensi kuman. Namun terapi kombinasi antibiotik tidak dianjurkan untuk pemakaian jangka lama untuk mencegah kemungkinan timbulnya toksisitas obat, superinfeksi maupun resistensi obat (Tambunan, 2004).

Penggunaan kombinasi obat bertujuan mampu mengenai banyak target, menyerang berbagai subpopulasi, atau berbagai penyakit. Penggunaan kombinasi obat dengan berbeda mekanisme atau aksi kerja dapat mempengaruhi secara langsung terhadap target utama atau penyakit dan mampu mengobati lebih efektif. Kombinasi obat yang baik dapat meningkatkan efikasi dari efek terapeutik, mampu menurunkan dosis obat namun kerjanya meningkatkan atau menjaga efek yang sama untuk mencegah toksisitas, meminimalisir atau memperlambat resistensi obat, mampu bekerja secara selektif target. Keuntungan pengobatan kombinasi inilah yang menyebabkan penggunaan kombinasi obat sering diterapkan secara luas dan menjadi pilihan terapi untuk mengobati berbagai penyakit mematikan seperti kanker dan penyakit infeksi termasuk AIDS (Chou, 2006).

Ada beberapa istilah dari kombinasi obat yakni tentang sinergisme dan peningkatan obat (*enhancement*). Ketika kedua obat A dan B dikombinasi namun kedua sifat obat berbeda (misal obat antibiotik dengan non antibiotik) maka efek kombinasi obat tersebut berarti meningkatkan efek obat salah satunya. Sedangkan ketika obat A dan B dikombinasi dengan sifat yang sama (misal obat antibiotik dengan antibiotik) maka efek kombinasi obat disebut sinergis, aditif (konstan), atau antagonis (Chou, 2006).

2.5.2 Interaksi Obat

Interaksi obat terhadap ciprofloxacin yang sudah umum diketahui yakni interaksi yang melibatkan derivat xantin dan kation multikovalen (senyawa kimia tabel periodik VIII). Ciprofloxacin mengurangi metabolisme xantin seperti teofilin dapat meningkatkan konsentrasi plasma. Pemberian ciprofloxacin bersama obat yang mengandung aluminium atau magnesium untuk antasid, besi, kalsium atau zinc, didanosin, dan sukralfat mampu mengurangi bioavailabilitas ciprofloxacin. Bioavailabilitas rata – rata dapat berkurang sebesar 53%-67% sehingga dianjurkan ciprofloxacin dikonsumsi 2 jam sebelum atau 6 jam sesudah konsumsi obat mengandung kation multivalen. Pola pengosongan lambung pada tiap pasien berbeda beda dan tidak dapat dikontrol oleh karena itu dianjurkan untuk menghindari konsumsi obat kation multikovalen dengan ciprofloxacin jika memungkinkan. Jarang dilaporkan pada kombinasi ciprofloxacin dengan fenitoin dikarenakan dapat meningkatkan konsentrasi serum fenitoin. Pada beberapa kasus juga didapatkan konsumsi ciprofloxacin dengan glibenklamid sulfonilurea menyebabkan hipoglikemi (Davis *et al.*, 1996).

Tabel 2.2 Interaksi Obat dengan Ciprofloxacin

Obat	Efek	Mekanisme	Penanganan
Metilxantin			
Teofilin	Meningkatkan konsentrasi plasma teofilin (sampai 308%) dengan kemungkinan toksisitas teofilin (mual, muntah, palpitasi, kejang)	Menghambat sitokrom P450 isoenzim berperan untuk metabolisme teofilin	Monitoring konsentrasi serum teofilin ketika ciprofloxacin ditambahkan terutama pada pasien usia lanjut
Kafein	Meningkatkan konsentrasi plasma kafein dengan efek samping (khawatir, insomnia)	Menghambat sitokrom P450 isoenzim berperan untuk metabolisme kafein	Membatasi konsumsi kafein berlebihan

Kandungan Kation**Multivalen**

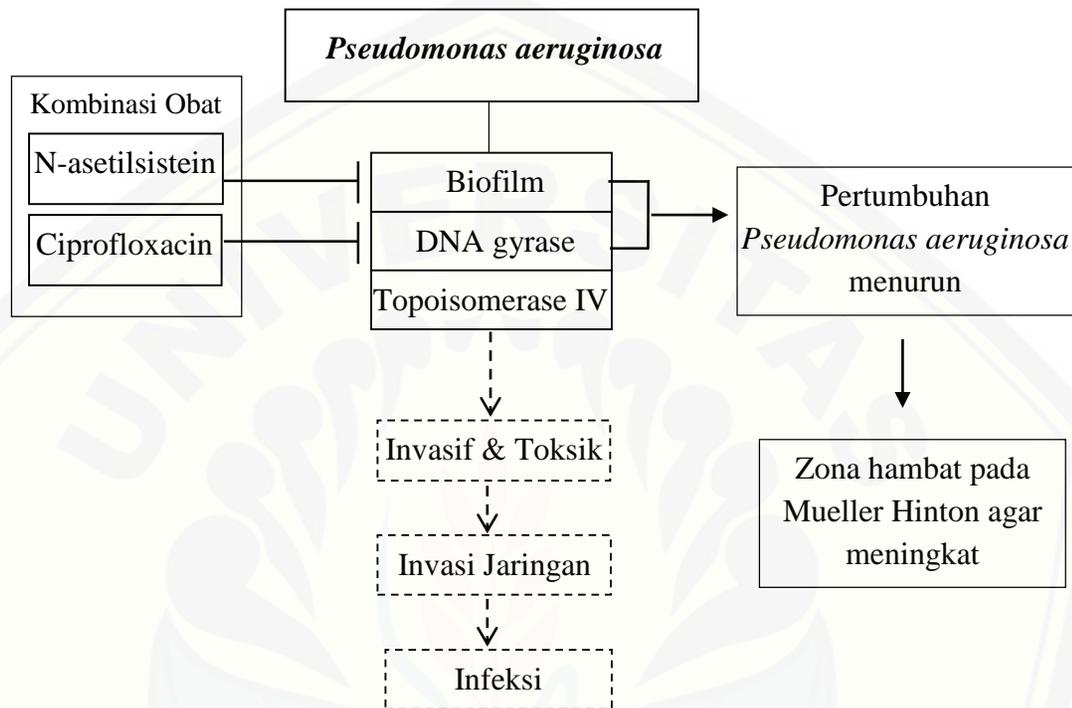
Alumunium atau magnesium mengandung antasid Sukralfat Kalsium dan makanan kaya kalsium Besi Zinc Didanosine	Mengurangi absorpsi ciprofloxacin (sampai 99%) yang menyebabkan kegagalan pengobatan	<i>Chelation</i> (ion dan molekul berikatan dengan ion logam) antara logam dengan ciprofloxacin.	Hindari konsumsi obat kandungan ini atau konsumsi ciprofloxacin 2 jam sebelum atau 6 jam setelah mencerna obat dengan kandungan ini.
Warfarin	Meningkatkan efek hipoprotrombinemik warfarin	Menurunkan metabolisme warfarin	Monitor waktu protrombin atau tes koagulasi terutama pada pasien usia lanjut
Fenitoin	Meningkatkan atau menurunkan konsentrasi plasma fenitoin	Menghambat sitokrom P450 isoenzim berperan untuk metabolisme fenitoin	Monitoring tingkat fenitoin dengan penggunaan bersamaan ciprofloxacin
Siklosporin	Peningkatan transien pada kreatinin serum dilaporkan pada beberapa pasien	Tidak diketahui	Monitoring tanpa penambahan siklosporin

Sumber: Davis *et al.*, 1996

Hanya beberapa interaksi obat N-asetilsistein yang telah diobservasi seperti parasetamol, glutathione, dan agen antikanker. Konsumsi bahan mengandung arang dapat mengganggu absorpsi obat hingga 96% obat terserap pada arang. N-asetilsistein pada dosis 140mg/hari diikuti pemberian oral 70mg/kg setiap 4 jam dapat secara langsung terkonjugasi dengan reaktif metabolit parasetamol. N-asetilsistein dapat berperan sebagai prekursor glutathione dan memfasilitasi biosintesis glutathione sehingga dapat mengganggu reaktif oksigen spesies secara langsung dengan cara mengurangi nonenzimatiknya. Konsumsi dengan ifosfamid/siklofosfamid tidak berinteraksi dengan metabolisme agen antitumor ini dan N-asetilsistein memberikan perlindungan lokal pada ginjal, ureter, kandung kemih, dan uretra terhadap toksisitas ifosfamid/siklofosfamid. Penggunaan bersamaan N-asetilsistein dengan doxoubisin membantu mencegah kardiomiopati yang diinduksi oleh doxoubisin. Penggunaan N-asetilsistein secara umum dapat dikatakan aman (Holdiness, 1991).

2.6 Kerangka Konseptual Penelitian

Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Skema kerangka konseptual penelitian

Keterangan :

→ : diteliti

—| : menghambat

--> : tidak diteliti

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang bersifat invasif dan toksik sehingga mampu menginvasi jaringan dan menyebabkan berbagai macam infeksi. Kombinasi obat N-asetilsistein dan ciprofloxacin bekerjasama untuk menurunkan produksi biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. N-asetilsistein memiliki sifat sebagai antibiofilm sedangkan ciprofloxacin memiliki sifat penghambatan bakteri melalui DNA gyrase bakteri.

Efek dari kombinasi obat ciprofloxacin dan N-asetilsistein diharapkan dapat bekerja sama untuk mengeradikasi pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Efektivitas obat tersebut dalam pertumbuhan bakteri nantinya dapat dilihat melalui diameter zona hambat pada media Mueller Hinton agar yang semakin meningkat.

2.7 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini yakni kombinasi N-asetilsistein dan ciprofloxacin memiliki efek meningkatkan penghambatan pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

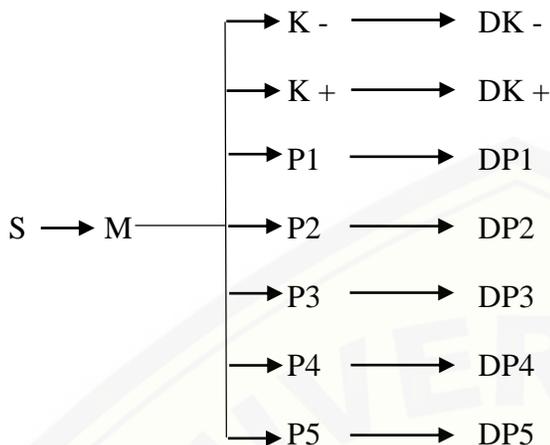
Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris karena efek yang terjadi merupakan manipulasi peneliti pada variabel bebas dan penelitian dilakukan di laboratorium (Pratiknya, 2003). Penelitian eksperimen adalah penelitian yang mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel lain (Sedarmayanti dan Syarifudin, 2002). Jenis penelitian eksperimental yang digunakan adalah *quasi experimental*.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini merupakan 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 7 kelompok yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol (negatif dan positif). Rancangan penelitian dan pengulangan dapat dilihat pada skema 3.1.

Kelompok kontrol negatif menggunakan larutan akuades sedangkan kelompok kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin 1mg/ml. Kelompok yang diberi perlakuan terdiri N-asetilsistein dengan konsentrasi 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20mg/ml kombinasi dengan antibiotik ciprofloxacin konsentrasi tetap 1mg/ml. Penentuan konsentrasi didasarkan pada penelitian El-Feky tahun 2009 yang menggunakan konsentrasi 2 mg/ml dan 4 mg/ml serta penelitian Zhao tahun 2010 dengan konsentrasi N-asetilsistein 10 mg/ml hingga 40 mg/ml.



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Sampel merupakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
- M : Media
- K (-) : *Pseudomonas aeruginosa* + akuades
- K (+) : *Pseudomonas aeruginosa* + ciprofloxacin 1mg/ml
- P1 : *Pseudomonas aeruginosa* + ciprofloxacin 1mg/ml
+ N-asetilsistein 1,25mg/ml
- P2 : *Pseudomonas aeruginosa* + ciprofloxacin 1mg/ml
+ N-asetilsistein 2,5mg/ml
- P3 : *Pseudomonas aeruginosa* + ciprofloxacin 1mg/ml
+ N-asetilsistein 5mg/ml
- P4 : *Pseudomonas aeruginosa* + ciprofloxacin 1mg/ml
+ N-asetilsistein 10mg/ml
- P5 : *Pseudomonas aeruginosa* + ciprofloxacin 1mg/ml
+ N-asetilsistein 20mg/ml
- DK (-) : Diameter zona hambat pada kelompok kontrol negatif
- DK (+) : Diameter zona hambat pada kelompok kontrol positif
- DP (1-5) : Diameter zona hambat perlakuan 1 sampai 5

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang telah disesuaikan dengan 0,5 Mc Farland standar ($1 - 1,5 \times 10^8$). Pengulangan dalam percobaan ini dihitung berdasarkan rumus Federer (Hanafiah, 2010) :

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

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

$$6r-6 \geq 15$$

$$r \geq 3.5$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

Berdasarkan perhitungan rumus Federer didapatkan syarat $r \geq 3.5$, maka jumlah pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Persiapan strain bakteri, media, persiapan pengenceran obat antibiotik dan N-asetilsistein dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan selama satu bulan yaitu bulan November 2015.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi N-asetilsistein sebagai obat kombinasi yaitu 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penghambatan pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* yang ditunjukkan oleh diameter zona hambat

3.5.3 Variabel Kendali

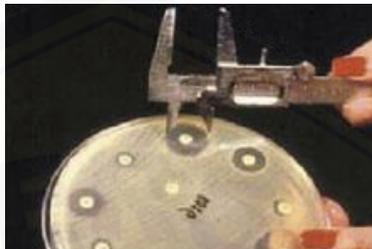
Variabel kendali penelitian ini meliputi:

- a. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
- b. Penghitungan konsentrasi obat
- c. Lama inkubasi
- d. Suhu inkubator

3.6 Definisi Operasional

- a. Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- b. Antibiotik yang digunakan adalah obat generik ciprofloxacin 500mg. Diberikan dalam konsentrasi yang sama pada setiap kelompok perlakuan yaitu 1mg/ml. Antibiotik dipersiapkan sesuai dengan mekanisme kerja dalam *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012*.
- c. Konsentrasi N-asetilsistein yang diberikan adalah obat sediaan kapsul 200mg. Obat dipersiapkan (*stock solutions*), lalu diberikan dalam konsentrasi yang berbeda pada setiap kelompok perlakuan untuk mengetahui konsentrasi berapa yang memiliki efek penghambatan bakteri paling baik. Konsentrasi 1,25mg/ml untuk kelompok perlakuan pertama, 2,5mg/ml untuk kelompok perlakuan kedua, 5mg/ml untuk kelompok perlakuan ketiga, 10mg/ml untuk kelompok perlakuan keempat, dan 20mg/ml untuk kelompok perlakuan kelima.
- d. Kombinasi ciprofloxacin dan N-asetilsistein dilakukan dengan cara mencampurkan *stock solution* ciprofloxacin konsentrasi tetap 1mg/ml dan N-asetilsistein dengan konsentrasi berbeda tiap kelompok perlakuan yaitu 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml pada vial.
- e. Uji kepekaan yang digunakan adalah metode *disc diffusion* dengan interpretasi hasil menggunakan jangka sorong pada bagian belakang cawan petri untuk menghitung diameter zona hambat dalam satuan mm (CLSI, 2012).

- f. Diameter zona hambat merupakan daerah bening sekitar disk ditimbulkan dari kerja antibiotik dalam disk yang mulai berdifusi di sekeliling agar dan menghambat pertumbuhan bakteri (Hudzicki, 2009).



Gambar 3.2 Pengukuran Diameter Zona Hambat Menggunakan Jangka Sorong (Cavalieri, 2005)

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah inkubator, cawan petri, autoklaf, vortex, vial, jarum ose, jangka sorong, kertas label, masker, *handschoon*, mikropipet, disk kosong oxoid, lampu bunsen, korek api, selotip, gunting, kapas, lidi kapas, tissue, mortar, *disposable sringe*, sterilisator, tabung reaksi, standar Mc Farland dan rak reaksi.

3.7.2 Bahan

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah *nutrient agar* guna menumbuhkan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, akuades, suspensi ciprofloxacin 500mg, suspensi N-asetilsistein 200mg, *Muller Hinton* agar.

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 menggunakan cakram kosong steril oxoid.

3.8.2 Pembuatan Media

Media *nutrient agar* dalam bentukan serbuk yang telah tersedia dalam kemasan. Jumlah serbuk ditimbang sesuai dengan kebutuhan. Serbuk dilarutkan dalam akuades, cara pembuatan sesuai petunjuk pada kemasan, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dituang dalam cawan petri dan didiamkan pada suhu kamar hingga padat (Hadioetomo, 1993).

3.8.3 Pemeliharaan Bakteri

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* induk diambil dengan mata ose, kemudian digoreskan pada media *nutrient agar* yang dicampur dengan gliserol, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 -24 jam. Bakteri tersebut disimpan pada suhu 4°C dan digunakan sebagai stok bakteri (Mahon *et al.*, 2015).

3.8.4 Pembuatan Larutan Mc Farland

Standar *Mc Farland* dibuat dengan cara mencampur 9,95 ml asam sulfur 1% dengan 0,05ml barium klorida 1%. Kemudian tabung disegel dan digunakan untuk menghitung suspensi bakteri standar (Mahon *et al.*, 2015).

3.8.5 Penyiapan Suspensi Bakteri

Suspensi dibuat dengan mengambil satu ose kuman dan kultur kemudian dimasukkan ke *Nutrient Broth Agar* selanjutnya diinkubasi 30°C selama 24 jam. Setelah 24 jam suspensi kuman yang telah diinkubasi disesuaikan dengan standar larutan 0,5 Mc Farland (1×10^8 CFU/ml) dengan menambahkan akuades steril (Hadioetomo, 1993).

3.8.6 Persiapan Uji *Disc Diffusion*

Suspensi bakteri di vortex 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 *Mueller Hinton* agar. Ratakan koloni bakteri pada permukaan media dengan cara mengoleskan lidi kapas pada 3 arah sambil diputar 60°. Lalu biarkan agar 3-5 menit (CLSI, 2012).

3.8.7 Pembuatan *Stock Solution* Ciprofloxacin dan N-asetilsistein

- a. Untuk membuat *stock solution* ciprofloxacin dibutuhkan solvent/pelarut berupa akuades (Cayman, 2013). Ciprofloxacin disiapkan dalam bentuk serbuk sesuai dosis terapi sebanyak 500mg lalu disuspensikan pada 10 ml akuades sehingga konsentrasi yang diperoleh 50mg/ml lalu disuspensikan kembali 9ml akuades sehingga konsentrasi menjadi 5mg/ml dan disuspensikan kembali dengan 4ml akuades sehingga mendapat konsentrasi 1mg/ml ciprofloxacin.
- b. Untuk membuat *stock solution* N-asetilsistein dibutuhkan pelarut akuades (Abcam, 2015). N-asetilsistein disiapkan dalam bentuk serbuk 200mg. Selanjutnya diencerkan dengan akuades 10ml, lalu dibuat seri pengenceran hingga memperoleh konsentrasi larutan sebagai berikut 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, dan 20mg/ml.

3.8.8 Uji kombinasi Ciprofloxacin dan N-asetilsistein.

Uji aktivitas antibakteri ciprofloxacin kombinasi N-asetilsistein terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi cakram Kirby Bauer. Metode ini menggunakan piringan yang berisi cairan antibiotik diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik pada permukaan media agar, sehingga prinsip penetapannya yaitu dengan mengukur diameter zona terang yang merupakan zona hambat dari zat yang diuji (Cavalieri, 2005).

Cara kerja yaitu campurkan *stock solution* ciprofloxacin dan N-asetilsistein dengan berbagai konsentrasi pada cawan petri. Ambil cakram kosong kemudian ditetesi dengan antibiotik kombinasi N-asetilsistein menggunakan mikropipet. Selanjutnya, biakan *Pseudomonas aeruginosa* pada media agar diswab dengan kapas biakan bakteri secara merata pada media MHA dengan merata. Cakram yang sudah ditetesi dengan obat kombinasi dikeringkan dan kemudian diletakkan diatas media dengan menggunakan pinset steril. Cakram yang sudah diberi akuades (kontrol negatif)

juga diletakkan pada media. Media kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam dan diamati, daerah bening di sekitar cakram menggambarkan zona hambat. Diameter zona hambat yang telah diperoleh tersebut kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong (Cavalieri, 2005).

3.9 Parameter yang diuji

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

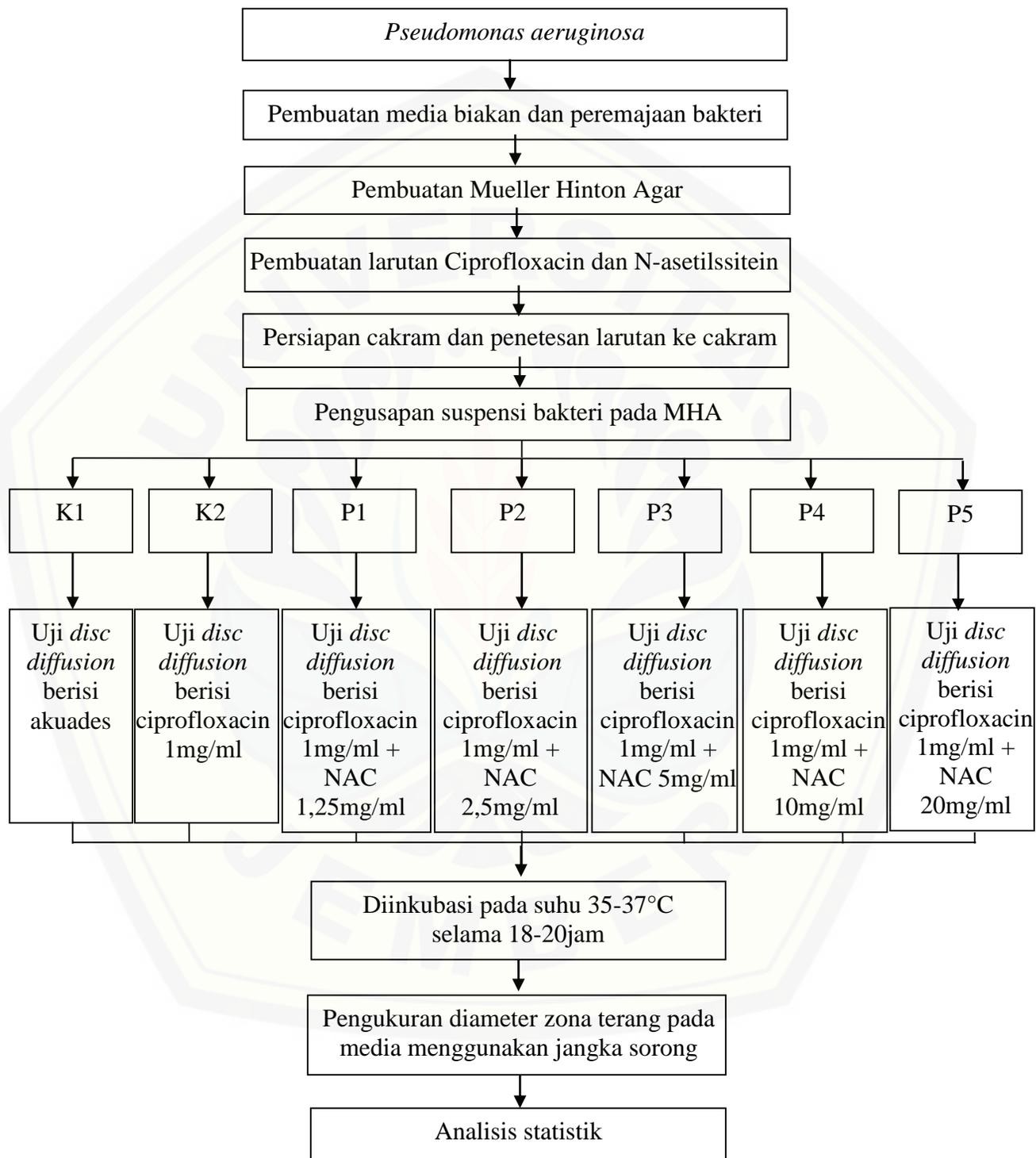
3.10 Interpretasi Efek Kombinasi

Interpretasi efek kombinasi N-asetilsistein dan ciprofloxacin 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 didapatkan dari pengukuran diameter zona hambat pada media. Analisis data menggunakan beberapa uji analisis. Pertama uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Untuk mengetahui distribusi data yang dibandingkan mempunyai varian yang sama atau tidak digunakan uji varian *Levene's*. Selanjutnya untuk mengetahui efek pemberian kombinasi ciprofloxacin dan N-asetilsistein dengan konsentrasi bertingkat terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* digunakan uji korelasi Pearson. Analisis data dilanjutkan menggunakan uji Regresi Logaritmik untuk mengetahui konsentrasi terkecil yang mampu mempengaruhi pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* (Dahlan, 2009).

3.12 Skema Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3.3 Skema Pelaksanaan Penelitian