

ARTIKEL PENELITIAN

Uji Daya Hambat Antibakteri Kombinasi Ekstrak Kulit Buah Manggis Komersial (*Garcinia mangostana* L) dan Amoksisilin Terhadap Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

*Atna Permana^{1,2}, Mazlan N³

¹⁾ Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Kesehatan, Universitas Mohammad Husni Thamrin, Jakarta, Indonesia

²⁾ Post Graduate Center, Management and Science University, 4100 Shah Alam Selangor Malaysia

³⁾ Borneo Marine Research Institute, Universiti Malaysia Sabah, Jalan UMS, 88400 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia

*Correspondence Author: Atna Permana, atnap@yahoo.com, Jakarta, Indonesia

ABSTRAK

Amoksisilin merupakan salah satu senyawa antibiotik golongan beta-laktam dan memiliki nama kimia alfa-amino-hidroksilbenzil-penisilin. Obat ini awalnya dikembangkan memiliki keuntungan lebih dibandingkan ampicilin yaitu dapat diabsorpsi lebih baik di traktus gastrointestinal. Kandungan kimia kulit buah manggis (KBM) manggis adalah xanton, mangostin, garsinon, flavonoid, dan tanin. Selain itu, mangostenol, mangostenon A, mangostenon B, trapezifolixanton, tovofilin B, alfa mangostin, beta mangostin, garsinone B, mangostinon, epikatekin, dan mangostanol. Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) memiliki banyak sifat farmakologi; KBM juga memiliki sifat antimikroorganisme. Diperkirakan bahwa alfa mangostin dan atau ekstrak KBM bekerja dengan cara yang mirip dengan amoksisilin, yaitu menghentikan pembentukan dinding sel bakteri. Alfa mangostin (flavonoid) atau ekstrak KBM (asam klavulanat) memiliki gugus atau zat aktif yang mirip. Tujuan penelitian ini untuk Membuktikan mekanisme kerja antibakteri kombinasi ekstrak KBM (*Garcinia mangostana* L) dengan amoksisilin terhadap pertumbuhan sel bakteri MRSA. simpulan KHM ekstrak GML komersial, amoksisilin terhadap MRSA masing-masing adalah 137,50 µg / mL dan 250,00 µg / mL. Tes papan catur (*Checkerboard test*) menunjukkan aktivitas sinergis GML komersial (34,38 µg / mL) ditambah amoksisilin (62,50 µg / mL) terhadap *Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) atau *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-3. Indeks FIC amoksisilin plus GML terhadap strain MRSA adalah 0,50. Aktivitas sinergis dari kombinasi ini telah dikonfirmasi oleh pengurangan 2 log₁₀ CFU / mL dari sel-sel yang diberi perlakuan dibandingkan dengan perlakuan amoksisilin tunggal. Simpulan bahwa kombinasi antara ekstrak kulit buah manggis komersial dan amoxicillin mampu menghambat pertumbuhan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Kata kunci : Alfa mangostin, amoxicillin, *Staphylococcus aureus*, FIC

ABSTRACT

Amoxicillin is a beta-lactam antibiotic compound and has the chemical name alpha-amino-hydroxylbenzyl-penicillin. This drug was initially developed to have an advantage over ampicillin: it can be better absorbed in the digestive tract. The chemical contents of mangosteen rind (KBM) are xanthone, mangostin, garsinone, flavonoids and tannins. In addition, mangostenol, mangostenone A, mangostenone B, trapezifolixanton, tovofilin B, alpha mangostin, beta mangostin, garsinone B, mangostinone, epicatechin, and mangostanol. Mangosteen (*Garcinia Mangostana* L.) has many pharmacological properties; KBM also has antimicroorganism properties. It is estimated that alpha mangostin and/or KBM extract works in a similar way to amoxicillin, namely stopping the formation of bacterial cell walls. Alpha mangostin (flavonoid) or KBM extract (clavulanic acid) have similar

groups or active substances. The aim of this research is to prove the antibacterial mechanism of action of the combination of KBM (*Garcinia mangostana* L) extract with amoxicillin on the growth of MRSA bacterial cells. Conclusion: The MIC of commercial GML extract, amoxicillin against MRSA is 137.50 µg/mL and 250.00 µg/mL respectively. The checkerboard test showed synergistic activity of commercial GML (34.38 µg/mL) plus amoxicillin (62.50 µg/mL) against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-3. The FIC index of amoxicillin plus GML against MRSA strains was 0.50. The synergistic activity of this combination was confirmed by a 2 log₁₀ CFU/mL reduction of these treated cells compared with amoxicillin treatment alone. Conclusion that the combination of commercial mangosteen peel extract and amoxicillin is able to inhibit the growth of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Key words: *Alpha mangostin, amoxicillin, Staphylococcus aureus, FIC*

PENDAHULUAN

Menurut *Centers for Disease Control and Prevention*, setiap tahun di Amerika Serikat terdapat dua juta orang terinfeksi oleh bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik dan setidaknya 23.000 orang meninggal setiap tahun sebagai akibat langsung dari resistensi ini (Jiménez *et al.*, 2013). Data tersebut menunjukkan bahwa resistensi antimikroba memang telah menjadi masalah global yang harus segera diselesaikan karena merupakan ancaman yang tidak hanya bagi lingkungan yang berkaitan tetapi juga bagi masyarakat luas (Ali Alghamdi *et al.*, 2023). Resistensi antibiotik terjadi pada seluruh negara di dunia. Pasien dengan infeksi yang terjadi akibat bakteri resisten berada pada risiko yang tinggi untuk mendapatkan outcome klinis yang lebih buruk, bahkan sampai kematian, dan menguras lebih banyak sumber daya pelayanan kesehatan dibandingkan dengan pasien yang terinfeksi oleh galur bakteri yang sama namun tidak resisten terhadap antibiotik (Turner *et al.*, 2019).

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi tersering di dunia. Tingkat keparahan infeksi pun bervariasi, mulai dari infeksi minor di kulit (furunkulosis dan impetigo), infeksi traktus urinarius, infeksi traktus respiratorius, sampai infeksi pada mata dan central nervous system (CNS) (Garoy *et al.*, 2019). *Staphylococcus aureus* menjadi masalah yang sangat serius karena peningkatan resistensi bakteri ini terhadap berbagai jenis antibiotik (*Multi Drug Resistance*). *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan adaptasi yang luar biasa sehingga bisa resisten pada banyak antibiotik (Shang *et al.*, 2019).

Antibiotika β-laktam telah lama digunakan dalam mengobati infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*. Namun, saat ini kurang efektif lagi mengingat kemampuan adaptasi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika β-laktam yang menyebabkan kepekaan *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika jenis ini berkurang, sehingga terjadi peningkatan resistensi (Akova, 2016). Resistensi *Staphylococcus aureus* dilaporkan pertama ketika

berkembangnya resistensi terhadap metisilin yang telah menyebabkan wabah infeksi antar rumah sakit pada tahun 1970an, sehingga dibutuhkan perhatian lebih mendalam terhadap infeksi yang didapat di rumah sakit (Garoy *et al.*, 2019; Tooke *et al.*, 2019). *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) tersebut kini telah menjadi penyebab infeksi pada kelompok berisiko di lingkungan rumah sakit yang disebut dengan hospital-associated MRSA (HA-MRSA) maupun kelompok tanpa risiko di lingkungan masyarakat yang disebut dengan community-acquired MRSA (CA-MRSA) (Chatterjee *et al.*, 2018). Prevalensi kejadian infeksi MRSA semakin meningkat, data menunjukkan bahwa dari 94.000 kasus infeksi di Amerika, angka morbiditas akibat infeksi MRSA mencapai 18.650 kasus (McGuinness, Malachowa and Deleo, 2017).

Sebagian isolat *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin dan golongan β -laktam terjadi karena adanya modifikasi protein pengikat penisilin/*Penicillin Binding Protein* (PBP). Protein ini mengkode peptidoglikan transpeptidase baru yang mempunyai afinitas rendah terhadap antibiotik β -laktam, sehingga terapi golongan β -laktam tidak responsif (Rolo *et al.*, 2017). Untuk mengatasi degradasi cincin β -laktam, beberapa antibiotika β -laktam dikombinasikan dengan senyawa inhibitor enzim β -laktamase seperti asam klavulanat, tazobactam, atau sulbactam (Foster, 2019). Kombinasi amoksisilin dan asam klavulanat terbukti telah berhasil mengatasi infeksi bakteri pada saluran kemih. Asam klavulanat memiliki kemampuan untuk menghambat sisi aktif enzim β -laktamase sehingga menyebabkan enzim tersebut menjadi inaktif (Grema *et al.*, 2015).

Sudah lebih dari 4 dekade vankomisin menjadi obat pilihan (*drug of choice*) dalam mengobati infeksi MRSA. Namun sejak tahun 1996 timbul kekhawatiran karena ditemukan penyebaran MRSA yang menurun kepekaannya terhadap vankomisin (McGuinness, Malachowa and DeLeo, 2017), masalah menjadi semakin rumit dengan ditemukannya galur MRSA yang resisten vankomisin (Saber *et al.*, 2022). Meskipun banyak antibiotik baru yang dapat menjadi pilihan dalam pengobatan MRSA seperti linezolid dan daptomisin, obat-obat baru ini memiliki efek samping yang cukup serius, misal gagal ginjal dan gangguan pencernaan (McGuinness, Malachowa and DeLeo, 2017).

Penelitian dan pengembangan senyawa antibiotika baru atau antimikroba dari tanaman dianggap penting dan memberikan harapan baru untuk penelitian selanjutnya. Selain itu, antimikroba yang berasal dari tanaman juga dipercaya memiliki efek samping yang minimal (Janardhan *et al.*, 2017) Strategi lain dalam pengembangan senyawa antimikroba adalah

kombinasi obat, khususnya kombinasi bahan alam/tanaman sebagai ajuvan dengan antibiotik seperti amoksisilin (Cui *et al.*, 2023), merupakan salah satu upaya melawan bakteri yang resisten terhadap banyak antibiotika (*multidrug*).

Saat ini, banyak digunakan tanaman yang berefek sebagai antibiotika, misalnya manggis (Rahmiyani *et al.*, 2023), mangga (Yao *et al.*, 2023), daun jarak pagar (Megawati *et al.*, 2020) dan lain lain. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah buah manggis yang menurut hasil penelitian memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Permana *et al.*, 2017), antioksidan (Joung *et al.*, 2016) dan antimetastasis pada kanker usus.

Kandungan kimia kulit buah manggis (KBM) adalah xanton, mangostin, garsinon, flavonoid dan tanin (Altemimi *et al.*, 2017). Selain itu juga mengandung mangostenol, mangostenon A, mangostenon B, trapezifolixanton, tovoilin B, alfa mangostin, beta mangostin, garsinone B, mangostinon, mangostanol, epikatekin (Aravind *et al.*, 2017). Selain memiliki beberapa aktivitas farmakologi, KBM juga menunjukkan aktivitas antimikroorganisme. Suksamrarn dkk.(Janardhan *et al.*, 2017), melakukan penelitian potensi antituberkulosis dari senyawa xanton yang diisolasi dari kulit buah manggis. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa alfa mangostin, gamma-mangostin dan garsinon B menunjukkan aktivitas paling poten dan menghambat kuat terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, namun demikian mekanisme kerja senyawa tersebut belum diketahui dengan jelas. Hasil temuan Suksamrarn dkk.(Janardhan *et al.*, 2017) ditindaklanjuti oleh Sakagami dkk, (H. R.W. Dharmaratne *et al.*, 2013) yang difokuskan pada alfa-mangostin, yang diisolasi dari kulit batang pohon untuk memperoleh jumlah yang besar. Alfa mangostin aktif terhadap bakteri Enterococci dan *Staphylococcus aureus* yang masing-masing resisten terhadap vankomisin dan metisilin.

Berdasarkan penelitian Dharmartne dkk, tampak bahwa senyawa alfa mangostin yang terkandung dalam ekstrak KBM mempunyai aktivitas antibakteri terhadap Enterococci resisten penisilin dengan minimum inhibitory concentration (MIC)/Kadar Hambat Minimum (KHM) 6,25 µg/ml dan MRSA dengan KHM 6,25-12,5 µg/ml (H R W Dharmaratne *et al.*, 2013) Penelitian yang dilakukan oleh Janardhan dkk, juga menunjukkan bahwa alfa mangostin sebagai antibakteri terhadap 49 spesies bakteri, salah satunya adalah pada MRSA dengan KHM 1,57-12,5 µg/mL, namun demikian mekanisme kerja dari senyawa tersebut belum diketahui dengan jelas(Janardhan *et al.*, 2017).

Penelitian pola kepekaan kuman terhadap antibiotika di ruang rawat intensif rumah sakit Fatmawati Jakarta, retrospektif terhadap data sekunder kurun waktu 2001 – 2002,35

menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* dari 205 pasien telah resistens terhadap antibiotik amoksisilin yaitu sebesar 100%. Penelitian yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUD Dr. Moewardi dan Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran UNS Surakarta (Chudlori, Kuswandi and Indrayudha, 2012), pada spesimen berupa pus (nanah) pasien yang berkunjung atau dirawat di RSUD Dr. Moewardi periode Agustus-Oktober 2012. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kuman *Staphylococcus aureus* secara dominan ditemukan pada spesimen tersebut yaitu 30,19%. *Staphylococcus aureus* resisten terhadap amoksisilin sebesar 93,75% dan tetrasiklin 87,5%. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari kultur darah di LMK-FKUI tahun 2001-2006, resisten terhadap amoksisilin sebanyak 30,4% (2001-2002) dan meningkat menjadi 50% pada 2003-2004 dan 53,8% pada 2005-2006 (Baru and Fernando, 2009).

Dari penelitian awal di laboratorium Mikrobiologi FKUI, KHM alfa mangostin dan ekstrak KBM terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-38, sebesar 9,7 µg/mL dan 11,4 µg/mL. Hasil penelitian yang berkaitan dengan antibakteri alfa mangostin, ekstrak KBM maupun amoksisilin secara dosis tunggal sudah banyak dilaporkan (Permana *et al.*, 2017). Namun belum banyak penelitian mengenai mekanisme kerja kombinasi ekstrak KBM dan amoksisilin terhadap *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin (MRSA). Amoksisilin dipilih pada penelitian ini karena merupakan antibiotika yang banyak digunakan oleh masyarakat dan masih tergolong dalam obat esensial, yaitu obat terpilih yang paling dibutuhkan untuk pelayanan kesehatan, mencakup upaya diagnosis, profilaksis, terapi dan rehabilitasi, yang wajib tersedia di fasilitas kesehatan sesuai dengan fungsi dan tingkatnya (Siriwong *et al.*, 2016).

Mekanisme kerja alfa mangostin dan atau ekstrak KBM diduga sama dengan mekanisme kerja amoksisilin (Huttner *et al.*, 2020) yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri. Adanya kemiripan gugus atau zat aktif tertentu pada alfa mangostin atau ekstrak KBM (flavonoid) dan asam klavulanat, yaitu menghambat aktivitas enzim β-laktamase (Munita *et al.*, 2016; Siriwong *et al.*, 2016) sehingga mampu menghambat pembentukan dinding sel bakteri. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan pengujian mekanisme kerja aktivitas antibakteri kombinasi amoksisilin dengan ekstrak KBM (*Garcinia mangostana* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin (MRSA).

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan desain penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* untuk membuktikan pengaruh ekstrak KBM baik tunggal maupun kombinasi dengan antibiotik amoksisilin terhadap mekanisme pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi UMHT, dan Mikrobiologi RS Haji Jakarta. Waktu penelitian November 2019 – Maret 2020

Galur Bakteri

Galur bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-38, diperoleh dari PT Multiredjeki Kita. Stok bakteri disimpan dalam medium *Tryptic Soy Broth* (TSB, per liter; 17,0 g *Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)* [Becton Dickinson, Austalia], 3,0 g *Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)* [Becton Dickinson, Austalia], 2,5 g *glucose* [Becton Dickinson, Austalia], 5,0 g *Sodium Chloride* [Becton Dickinson, Austalia], *Dipotassium Hydrogen Phosphate* [Becton Dickinson, Austalia], mengandung 10% gliserol [Merck]. Setiap galur dibuat 4-5 tabung stok, stok bakteri selanjutnya disimpan di *freezer*, sampai digunakan.

Sel Mamalia

Sel mamalia yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sel BHK-21 [Sigma Aldrich], dari PT Elo Karsa Utama Jakarta

Pembuatan Medium *Mueller Hinton Broth* (MHB)

Serbuk media MHB [Oxoid, England] sebesar 21 g dilarutkan dalam 1 liter aquades, kemudian disterilkan pada *autoclave* selama 15 menit pada temperatur 121°C.

Pembuatan Stok alfa mangostin dan ekstrak KBM

Bahan yang digunakan adalah serbuk alfa mangostin (*analytical standard*, SigmaAldrich) dengan spesifikasi kemurnian $\geq 98.0\%$, diperoleh dari PT Elo Karsa Utama Jakarta. Sepuluh miligram bubuk alfa mangostin ditambahkan 1 mL DMSO. Setelah semua alfa mangostin larut,

campuran disaring menggunakan filter diameter 0,2 μm . Konsentrasi akhir dari larutan ini adalah 10 mg/mL. Ekstrak KMB dari PT Borobudur yang sudah jadi dalam bentuk kapsul, kadar ekstrak per kapsul 550 mg. Sepuluh miligram bubuk KBM ditambahkan 1 mL DMSO. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik amoksisilin 0,5 mg/L.

Cara Kerja Penelitian

Suspensi Bakteri 0.5 McFarland

Bakteri dari stok beku -20°C ditumbuhkan pada media agar *Mueller Hinton* (MHA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Satu koloni *Staphylococcus aureus* diinokulasi ke dalam 4 mL media *Mueller Hinton Broth* (MHB, per liter: 300 g *beef dehydrated infusion* [Oxoid, England], 17,5 g *casein hydrolysate* [Oxoid, England], 1,5 g *starch* [Oxoid, England]) dan kemudian diinkubasi di inkubator pada suhu 37°C , selama 16-18 jam, sampai jumlah sel setara 0.5 *McFarland* = 1.5×10^8 *colony forming units* (CFU/ml).

Suspensi bakteri untuk uji KHM alfa mangostin, ekstrak KBM dan amoksisilin

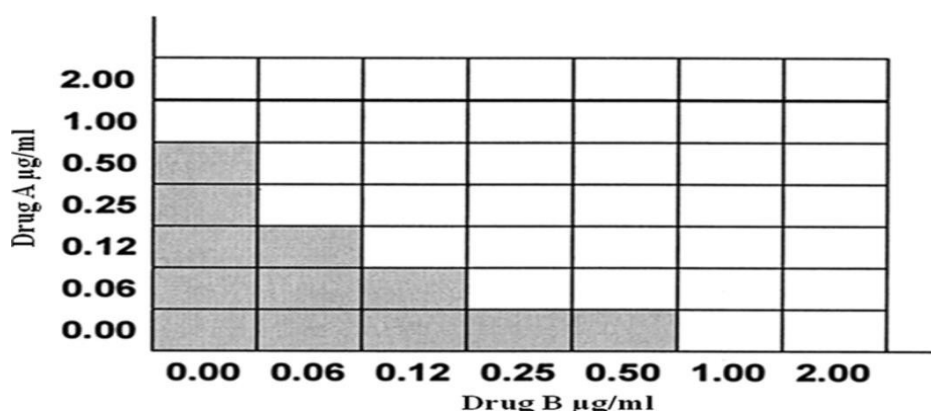
Dua ratus μL suspensi bakteri yang setara dengan 0.5 *McFarland* diambil dan kemudian dimasukan dalam 20 mL medium MHB dan dihomogenkan. Suspensi bakteri siap diinokulasikan.

Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) alfa mangostin, ekstrak KBM dan amoksisilin

KHM alfa mangostin dan ekstrak KBM ditentukan berdasarkan uji pengenceran berseri dengan konsentrasi 625, 312.5, 156.25, 78.13, 39, 19.5, 9.7, 4.9, 2.44 dan 1.22 $\mu\text{g/mL}$ dalam 100 μL medium MHB. Sedangkan ekstrak KBM dengan konsentrasi sebagai berikut 730, 365, 182.5, 91.25, 45.63, 22.8, 11.4, 5.7, 2.85, 1.43 dan 0.71 $\mu\text{g/mL}$, adapain untuk amoksisilin dengan konsentrasi berturut turut 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 dan 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Kontrol juga diikuti tanpa mengandung alfa mangostin, ekstrak KBM, amoksisilin dan kontrol DMSO. Ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 100 μL . Medium diinkubasi pada suhu 37°C 16-18 jam. Pertumbuhan bakteri diukur dengan mikrolat *reader* pada gelombang 560 nm. Untuk mengetahui jumlah sel, hasil uji ditumbuhkan pada media *Plate Count Agar* (PCA) dan koloni dihitung. Uji dilakukan sebanyak 3 kali. Konsentrasi alfa mangostin, ekstrak KBM dan amoksisilin minimal adalah konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri²⁰.

Penentuan MIC/KHM ekstrak KBM kombinasi dengan amoksisilin

Teknik penentuan KHM kombinasi dilakukan dengan metode *checkerboard titration*. Tabung reaksi kosong steril disiapkan dalam rak, sebanyak 7x7 (49 tabung) atau tergantung perkiraan terjadinya penurunan KHM. Larutan ekstrak KBM, alfa mangostin dan amoksisilin disiapkan dan dibuat berdasarkan KHM yang diperoleh pada uji KHM tunggal. Sebagai acuan konsentrasi larutan yang dibuat adalah 2x KHM, 1 KHM, 0,5 KHM dan seterusnya. Selanjutnya pada setiap tabung dicampurkan masing-masing obat uji satu banding satu, yaitu misalkan alfa mangostin (0,5 mL) + amoksisilin (0,5 mL), ekstrak KBM + amoksisilin. Sebagai ilustrasi dapat dilihat pada Gambar 1. Kemudian ke dalam tabung yang berisi campuran alfa mangostin + amoksisilin, ekstrak KBM + amoksisilin diinokulasikan sebanyak masing-masing 1 mL inokulum bakteri dan diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 16 -18 jam. Interpretasi hasil, KHM kombinasi adalah konsentrasi yang paling rendah dari kombinasi tersebut yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.



Gambar 1. Skema ilustrasi teknik *checkerboard*

Index FIC (*Fraction Inhibitory Concentration*) dihitung dengan menggunakan formula sebagai berikut : ^{20,83}

$$\frac{\text{KHM zat A pada kombinasi}}{\text{KHM zat A tunggal}} + \frac{\text{KHM zat B pada kombinasi}}{\text{KHM zat B tunggal}}$$

Keterangan Contoh : A : Amoksisilin

B : Ekstrak KBM Interpretasi index FIC :

- ☐ Jika indek FIC $\leq 0,5$ termasuk sinergis
- ☐ Jika indek FIC $> 0,5$ dan $\leq 1,0$ termasuk *indifferent*
- ☐ Jika indek FIC $> 1,0$ termasuk antagonis

Penentuan *Time-kill Curves*

Langkah yang dilakukan dalam melakukan uji *Time-kill* adalah:

1. Perencanaan konsentrasi uji

Berdasarkan KHM yang didapat pada uji penentuan KHM kombinasi, maka untuk uji *time-kill* dipilih KHM yang sinergis. Jika diperkirakan sinergis yaitu $FIC \leq 0.5$, kombinasi tes yang dibuat adalah setengah, seperempat atau seperdelapan kali KHM untuk setiap zat uji.

Persiapan konsentrasi stok alfa mangostin, ekstrak KBM dan amoksisilin Persiapan konsentrasi stok untuk uji *time-kill* sama seperti pada uji KHM.

2. Persiapan inokulum

Kuman yang telah diremajakan dalam medium MHB, kemudian dibuat suspensi setara dengan *Mc Farland* 1,0 ($\sim 3 \times 10^8$ CFU/mL). Setelah distandarisasi diambil 1 mL inokulum kemudian dimasukkan dalam 4 mL medium MHB (1 : 5) sehingga konsentrasi inokulumnya kurang lebih setara dengan 6×10^7 CFU/mL.

3. Inokulasi dan inkubasi

100 μ L inokulum bakteri yang mengandung 6×10^7 CFU/mL ditambahkan pada setiap tabung yang mengandung 10 mL medium MHB, yang meliputi 1 tabung medium MHBsteril sebagai kontrol, 1 tabung larutan alfa mangostin, 1 tabung larutan ekstrak KBM, 1 tabung larutan antibiotik amoksisilin, 1 tabung larutan kombinasi alfa mangostin + amoksisilin dan 1 tabung larutan kombinasi ekstrak KBM + amoksisilin sesuai KHM yang telah dibuat pada perencanaan konsentrasi larutan uji. Setelah persiapan inokulum, langkah selanjutnya adalah melakukan titrasi dari setiap tabung utama. Titrasi ini dilakukan dalam 4 waktu yaitu pada 0 jam, 4 jam, 8 jam dan 16 jam. Dibuat pengenceran berseri dalam tabung reaksi kecil yang telah berisi masing-masing 0,9 mL NaCl 0,85% steril. Pada 0 jam, yaitu tahap awal inokulasi organisme, disiapkan 3-4 seri pengenceran kelipatan 10 (sampai 10^5) yaitu dengan menambahkan 100 μ L inokulum dari tabung utama ke tabung pertama yang berisi 0,9 mL NaCl 0,85%, vorteks atau homogenkan dengan baik kemudian dari tabung pertama diambil 100 μ L dan dipindahkan pada tabung ke-dua dan seterusnya. Proses ini dilakukan dalam wadah dingin air es (*ice bath*). Hasil titrasi kemudian dilakukan *plating* dalam agar plat yaitu *Plate Count Agar*. Dari tabung yang telah dititrasi diambil sebanyak 100 μ L, ditanam dalam agar plat, kemudian dilakukan perataan. Agar plat diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 16-18 jam. Langkah tadi diulang pada jam ke 4, jam ke 8 dan jam ke 16 berikutnya.

4. Pembacaan dan pelaporan hasil

Perhitungan koloni dilakukan untuk agar plat yang tumbuh koloni antara 30 - 300 koloni. Dihitung koloni yang tumbuh dalam agar plat dari setiap tabung dan pada setiap waktu (0, 4, 8, 16 jam). Hasil dilaporkan dalam bentuk grafik, dengan cara menandai/menetapkan jumlah koloni yang didapat dalam setiap waktu untuk setiap tabung (tabung kontrol, tabung alfa mangostin, tabung ekstrak KBM, tabung amoksisilin, tabung kombinasi alfa mangostin + amoksisilin dan tabung ekstrak KBM + amoksisilin).

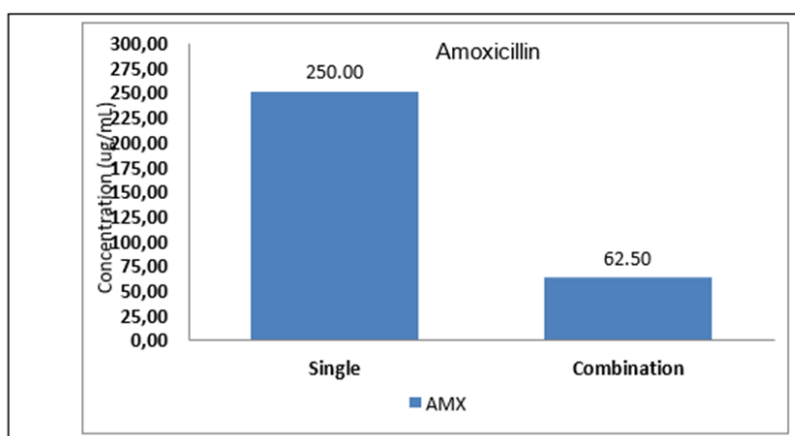
5. Analisis Statistik

Pengujian dilakukan 3 kali percobaan. Data KHM hasil uji yang ditampilkan merupakan hasil *means ± standard error of the mean* (SEM).

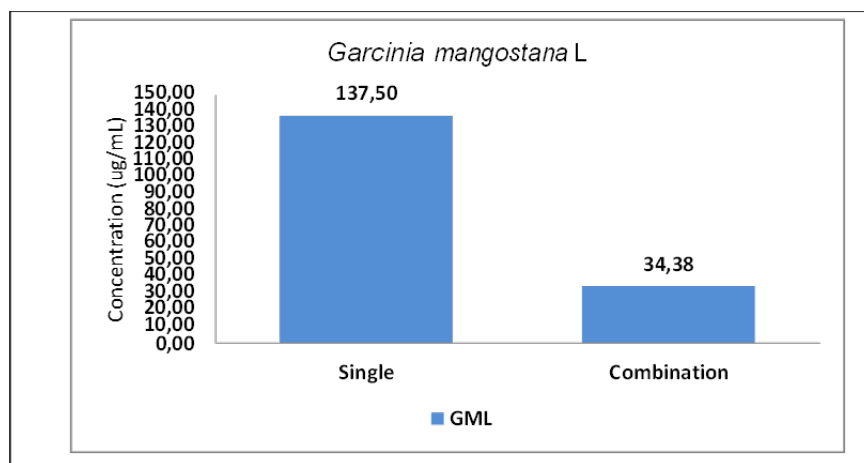
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kadar Hambatan Minimum (KHM)

Hasil Kadar Hambatan Minimum (KHM) ekstrak *Garcinia mangostana* L (GML) komersial, amoksisilin terhadap Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) masing-masing adalah 137,50 µg / mL dan 250,00 µg / mL. KHM kontrol α-mangostin (Sigma Aldrich) diperoleh sebesar 15,62 µg / mL. Hasil yang memberikan bukti bahwa strain MRSA ini resisten terhadap amoksisilin, pada Gambar 2 & 4.2. Uji Checkerboard menunjukkan aktivitas sinergis GML komersial ditambah amoksisilin. Indeks FIC amoksisilin ditambah GML komersial terhadap strain MRSA adalah 0,50. Sehingga kombinasi tersebut menunjukkan aktivitas sinergis terhadap MRSA.



Gambar 2. KHM dari Amoxicillin bila digunakan baik tunggal atau kombinasi terhadap MRSA



Gambar 3. KHM GML komersial bila digunakan baik tunggal atau kombinasi terhadap MRSA

Mekanisme kerja awal dari agen tersebut juga dievaluasi dalam penelitian ini. Resistensi antibiotik yang diresepkan secara praktis pada MRSA karena perubahan situs target obat, modifikasi enzim dan perubahan permeabilitas membran, semakin meningkat. Oleh karena itu, pemilihan antibiotik untuk mengobati MRSA yang resisten terhadap beberapa obat telah menurun setiap hari. Jadi, pendekatan penelitian untuk mengetahui agen anti-MRSA baru masih diperlukan (Mun *et al.*, 2013). Hasil MIC menunjukkan bahwa strain MRSA pengujian ini sangat resisten terhadap amoksisilin tunggal karena nilai standar sensitivitas amoksisilin terhadap strain tersebut adalah 0,25 µg / mL CLSI, 2013). Ekstrak GML menunjukkan sedikit efek bakteriostatik terhadap strain ini sementara strain *S. aureus* referensi rentan terhadap amoksisilin. Hasil untuk efek terpisah dan gabungan dari ekstrak GML dan amoksisilin pada jumlah MRSA yang layak disajikan pada Gambar 2 dan 3. Kombinasi studi saat ini dari ekstrak GML amoksisilin berkurang dari 250,00 µg / mL menjadi 62,50 µg / mL untuk amoksisilin dan 137,50 menjadi 34,38 untuk ekstrak GML. Phitaktimet al., KHM α-mangostin dan oksasilin yang diisolasi terhadap *Staphylococcus saprophyticus* resisten oksasilin masing-masing adalah 8 dan 128 µg / mL (Phitaktimet al., 2016a). Sedangkan setelah kombinasi didapatkan MIC α-mangostin dan oksasilin terhadap ORSA masing-masing adalah 2 µg / mL dan 16 µg / mL.

Analisis Indeks FIC / Fraction Inhibitory Concentration									
<i>Garcinia mangostana</i> L(GML)	GML								
	2.15								
	4.30								
	8.60								
	17.19								
	34.38			MIC					
	68.75								
	137.50								
	275.00								
	550.00								
	μg/mL	500	25	12	62.5	31.2	15.6	7.8	3.90
			0	5	0	5	0	0	AM
									X
Amoxicillin /AMX (μg/mL)									

Gambar 4. Hasil Teknik Papan Catur untuk ekstrak GML komersial ditambah amoksisilin terhadap MRSA

Dari hasil MIC tunggal dan kombinasi dihitung indeks konsentrasi hambat fraksional (FIC). Perhitungan indeks FIC untuk ekstrak GML komersial, amoksisilin dan kombinasinya adalah sebagai berikut:

$$\text{FIC dari ekstrak GML komersial} : \frac{34.38}{137.50} = 0.25$$

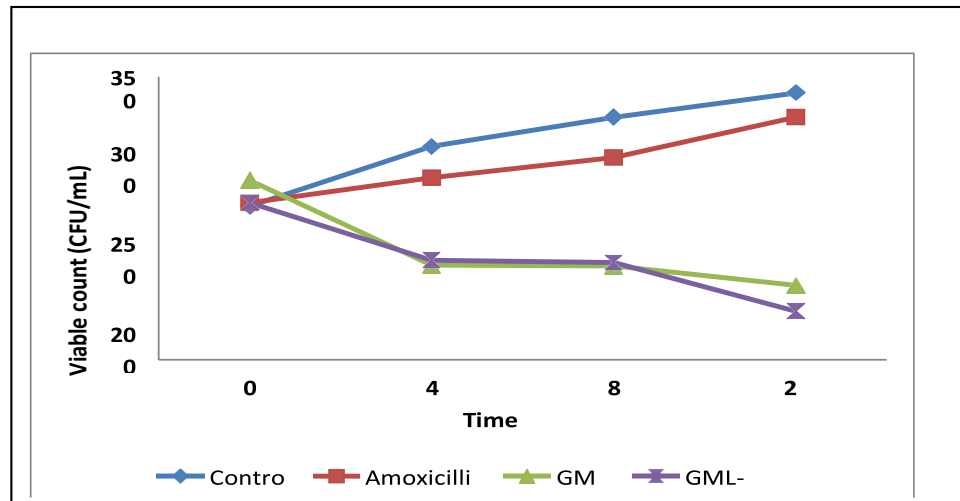
$$\text{FIC dari Amoksisilin} : \frac{62.50}{250.00} = 0.25$$

$$\text{FIC index l GML komersial + Amoxicillin} : 0,25 + 0,25 = 0,5$$

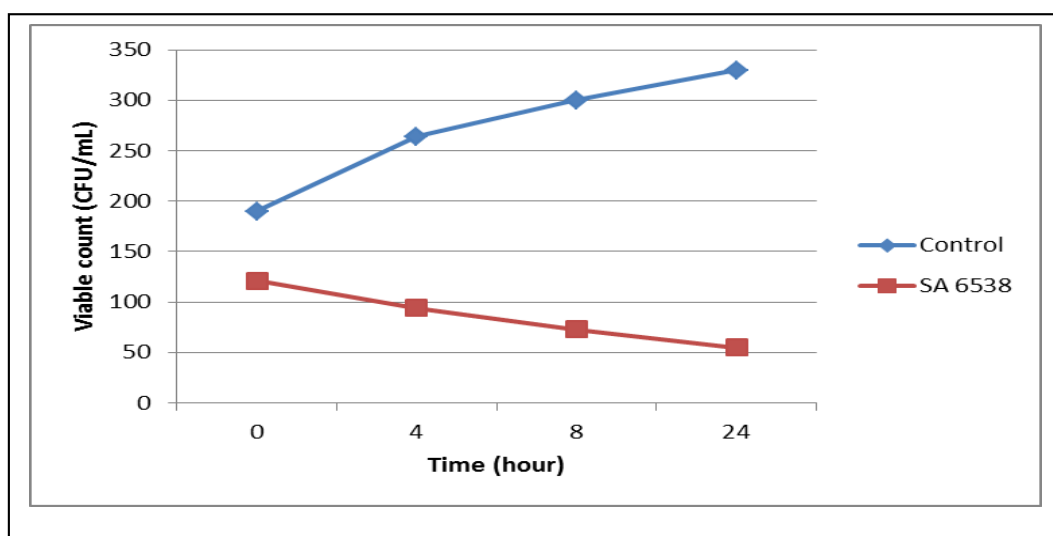
Penentuan papan catur mengungkapkan efek sinergis dari amoksisilin ditambah ekstrak GML terhadap strain MRSA dengan indeks FIC 0,5. Kontrol menunjukkan tidak ada penurunan jumlah CFU dari inokulum kontrol. Jumlah yang layak untuk sel yang diobati dengan ekstrak GML pada 137,50 µg / mL lebih rendah daripada amoksisilin pada 250,00 µg / mL. Kombinasi ekstrak GML komersial 34,38 µg / mL dan amoksisilin 62,50 µg / mL sangat menurunkan jumlah sel setelah 8 jam menjadi 24 jam. Aktivitas sinergis dari kombinasi ini telah dikonfirmasi oleh pengurangan 2 log 10 CFU / mL dari sel-sel yang diberi perlakuan ini dibandingkan dengan perlakuan amoksisilin tunggal. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Eumked et al., Bahwa quercetin plus amoxicillin menunjukkan aktivitas sinergis melawan strain *S. aureus* yang resisten terhadap penisilin pada indeks FIC <0,05 (Eumkeb et al., 2010). Selain itu, aktivitas antibakteri ekstrak GML ditambah amoksisilin terhadap strain MRSA meningkat secara signifikan dibandingkan dengan kontrol.

Analisis Kurva Survive / *Time Kill Curve*

Jumlah yang layak untuk MRSA setelah terpapar agen antimikroba pada waktu yang berbeda ditunjukkan pada Gambar 5. Sel perlakuan dengan GML komersial 137,50 µg / mL, tunggal ditampilkan menurun, amoksisilin 250,00 µg / mL meningkat. Sel kontrol menunjukkan tidak ada pengurangan jumlah yang layak dan pertumbuhan yang stabil dalam jumlah yang layak fase log selama 24 jam. Sedangkan, tidak ada perubahan signifikan yang diamati pada sel yang diberi ekstrak GML komersial dan kombinasi amoksisilin. Kurva waktu membunuh media pertumbuhan dan kontrol *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, pada Gambar 6.



Gambar 5. Kurva waktu membunuh MRSA setelah terpapar ekstrak GML komersial, amoksisilin baik tunggal maupun kombinasi



Gambar 6. Kurva waktu membunuh media pertumbuhan dan kontrol *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Efek sinergis ekstrak amoksisilin dan GML terhadap MRSA (*Staphylococcus aureus* ATCC BAA-38) dikonfirmasi dengan kurva pembunuhan karena sel-sel ini telah berkurang ≥ 2 log 10, CFU / mL (Moellering, 1993). Hasil ini sejalan dengan penelitian Phitaktim et al., Bahwa α -mangostin yang diisolasi dari *Garcinia mangostana* L. plus oxacillin menunjukkan aktivitas sinergis terhadap strain *Staphylococcus saprophyticus* yang resisten oksasilin pada indeks FIC 0,37 (Phitaktim et al., 2016a). Dengan cara yang sama, penelitian sebelumnya melaporkan bahwa efek sinergis dari Chomnawang et al., Yang melaporkan aktivitas

antibakteri dari senyawa bioaktif dari pericarp ekstrak GML terhadap MRSA (Chomnawang et al., 2009). Hasil ini menunjukkan bahwa kombinasi ini menunjukkan aktivitas sinergis melawan strain ini. Studi lain melaporkan efek flavonoid yang dikombinasikan dengan antibiotik terhadap bakteri MRSA dari Amin et al., Flavonoid ketika digunakan dalam kombinasi dengan antibiotik ditemukan meningkatkan aktivitas satu sama lain melawan bakteri uji (Amin et al., 2015). Temuan ini menunjukkan bahwa ekstrak GML tidak hanya memiliki beberapa aktivitas antibakteri terhadap strain ini tetapi juga dapat membalikkan resistensi strain bakteri tersebut melalui sinergi dengan amoksisilin.

SIMPULAN

Hasil KHM ekstrak GML komersial, amoksisilin terhadap MRSA masing-masing adalah 137,50 µg / mL dan 250,00 µg / mL. Tes papan catur menunjukkan aktivitas sinergis GML komersial (34,38 µg / mL) ditambah amoksisilin (62,50 µg / mL) terhadap Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) atau *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-3. Indeks FIC amoksisilin plus GML melawan strain MRSA adalah 0,50. Aktivitas sinergis dari kombinasi ini telah dikonfirmasi oleh pengurangan 2 log₁₀ CFU / mL dari sel-sel yang diobati ini dibandingkan dengan pengobatan amoksisilin tunggal.

REFERENSI

- Akova, M. (2016) 'Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections', *Virulence*, 7(3), pp. 252–266. doi: 10.1080/21505594.2016.1159366.
- Ali Alghamdi, B. et al. (2023) 'Antimicrobial resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(4), p. 103604. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103604.
- Altemimi, A. et al. (2017) 'Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts', *Plants*. doi: 10.3390/plants6040042.
- Amin, M. U. et al. (2015) 'Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*', *BMC Complementary and Alternative Medicine*. doi: 10.1186/s12906-015-0580-0.
- Aravind, A. et al. (2017) 'Structural diversity of secondary metabolites in *Garcinia* species', (November).
- Baru, P. M. and Fernando, A. (2009) 'Universitas Indonesia', p. 4240543.
- Chatterjee, A. et al. (2018) 'Risk Management and Healthcare Policy Dovepress is methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* infection associated with higher mortality and morbidity in hospitalized patients? a cohort study of 551 patients from south Western india', *Risk Management and Healthcare Policy*, pp. 11–243. doi: 10.2147/RMHP.S176517.
- Chudlari, B., Kuswandi, M. and Indrayudha, P. (2012) 'Pola Kuman dan Resistensinya Terhadap Antibiotika dari Spesimen PUS di RSUD Dr. Moewardi Tahun 2012', *Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta*, 13(2), p. 2012.

- Cui, K. *et al.* (2023) 'Synergistic Inhibition of MRSA by Chenodeoxycholic Acid and Carbapenem Antibiotics', pp. 1–10.
- Dharmaratne, H R W *et al.* (2013) 'Antibacterial activity of xanthenes from *Garcinia mangostana* (L.) and their structure-activity relationship studies.', *Natural product research*, 27(10), pp. 938–41. doi: 10.1080/14786419.2012.678348.
- Dharmaratne, H. R.W. *et al.* (2013) 'Antibacterial activity of xanthenes from *Garcinia mangostana* (L.) and their structure-activity relationship studies', *Natural Product Research*. doi: 10.1080/14786419.2012.678348.
- Foster, T. J. (2019) 'Can β -Lactam Antibiotics Be Resurrected to Combat MRSA?', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 26–38. doi: 10.1016/j.tim.2018.06.005.
- Garoy, E. Y. *et al.* (2019) 'Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and Antimicrobial Sensitivity Pattern among Patients - A Multicenter Study in Asmara, Eritrea', *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2019. doi: 10.1155/2019/8321834.
- Grema, H. *et al.* (2015) 'Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a review', *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 3(2), pp. 79–98. doi: 10.1056/NEJMr1313875.
- Huttner, A. *et al.* (2020) 'Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage', *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V., pp. 871–879. doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.028.
- Janardhan, S. *et al.* (2017) 'Antimicrobial effects of *Garcinia mangostana* on cariogenic microorganisms', *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(1), pp. ZC19–ZC22. doi: 10.7860/JCDR/2017/22143.9160.
- Jiménez, J. N. *et al.* (2013) 'A comparison of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* reveals no clinical and epidemiological but molecular differences', *International Journal of Medical Microbiology*, 303(2), pp. 76–83. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.12.003.
- Joung, D. K. *et al.* (2016) 'Antibacterial activity of oxyresveratrol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its mechanism', *Experimental and Therapeutic Medicine*. doi: 10.3892/etm.2016.3486.
- Mardiah, M. (2017) 'Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* Terhadap Antibiotik, Amoxillin, Tetracyclin dan Propolis', *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 8(2), pp. 1–6. doi: 10.20956/jal.v8i16.2978.
- McGuinness, W. A., Malachowa, N. and Deleo, F. R. (2017) *Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus*, *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*.
- McGuinness, W. A., Malachowa, N. and DeLeo, F. R. (2017) 'Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*', *Yale Journal of Biology and Medicine*. doi: 10.1201/9780849340574-15.
- Megawati *et al.* (2020) *Mangosteen Peel Antioxidant Extraction and Its Use to Improve the Stability of Biodiesel B20 Oxidation*. doi: 10.1007/978-3-030-39208-6_2.
- Munita, J. M. *et al.* (2016) 'Mechanisms of Antibiotic Resistance Jose', 4(2), pp. 1–37. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms.
- Narasimhan, S. *et al.* (2017) 'Anti-bacterial and anti-fungal activity of xanthenes obtained via semi-synthetic modification of α -mangostin from *Garcinia mangostana*', *Molecules*, 22(2). doi: 10.3390/molecules22020275.
- Permana, A. W. *et al.* (2017) 'Sifat Antioksidan Bubuk Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Instan Dan Aplikasinya Untuk Minuman Fungsional', *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*. doi: 10.21082/jpasca.v9n2.2012.88-95.
- Phitaktim, S. *et al.* (2016) 'Synergism and the mechanism of action of the combination of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-

- resistant *Staphylococcus saprophyticus*', *BMC Microbiology*. doi: 10.1186/s12866-016-0814-4.
- Rahmiyani, I. *et al.* (2023) ' α -Mangostin Content of Mangosteen Leaves (*Garcinia mangostana* L.) Based on Different Growing Conditions', *Planta Tropika*, 11(2), pp. 160–167. doi: 10.18196/pt.v11i2.16848.
- Rolo, J. *et al.* (2017) 'Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci', *PLoS Genetics*, 13(4). doi: 10.1371/journal.pgen.1006674.
- Saber, T. *et al.* (2022) 'Methicillin- and Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Humans and Ready-To-Eat Meat: Characterization of Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation Ability', *Frontiers in Microbiology*, 12(February), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2021.735494.
- Shang, D. *et al.* (2019) 'Synergistic Antibacterial Activity of Designed Trp-Containing Antibacterial Peptides in Combination With Antibiotics Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis*', *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2019.02719.
- Siriwong, S. *et al.* (2016) 'The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*', *BMC Pharmacology and Toxicology*. doi: 10.1186/s40360-016-0083-8.
- Tooke, C. L. *et al.* (2019) ' β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century', *Journal of Molecular Biology*, 431(18), pp. 3472–3500. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
- Turner, N. A. *et al.* (2019) 'Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research', *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), pp. 203–218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.
- Yao, T. L. *et al.* (2023) 'The origin of cultivated mangosteen (*Garcinia mangostana* L. var. *mangostana*): Critical assessments and an evolutionary-ecological perspective', *Ecology and Evolution*, 13(3), pp. 1–17. doi: 10.1002/ece3.9792.