

Frekuensi Resistensi pada *Enterococcus faecalis* Terhadap Dekokta Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dan Antibiotik Amoksisilin

Putri Lissanawidya*, Rio Risandiansyah**, Hardadi Airlangga**

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: putrilissanawidy@yahoo.co.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Penggunaan antibiotik yang tidak tepat akan menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik. Hal ini didukung dengan pengukuran frekuensi resistensi bakteri terhadap antibiotik. Aktivitas antibakteri juga ditemukan banyak pada obat herbal yang dikonsumsi sebagai obat tradisional, sehingga dimungkinkan resistensi terjadi pada obat herbal. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur frekuensi resistensi pada bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap dekok Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Metode yang digunakan akan dibandingkan dengan antibiotik Amoksisilin sebagai kontrol.

Metode: Metode sumuran dilakukan untuk mengukur zona inhibisi (ZOI). Tahap selanjutnya metode dilusi digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM). Uji frekuensi resistensi bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan metode Luria-Delbrück, dengan 5 plate dan 2 kontrol dan dilakukan 3 kali pengulangan. Hasil diuji secara statistik menggunakan Mann Whitney U Test ($p \leq 0.05$).

Hasil: ZOI dekok Rosella dan Amoksisilin sebesar 20 mm pada masing-masing konsentrasi 250 mg/ml dan 200 mg/ml. KHM dari dekok Rosella adalah sebesar 3,125 mg/ml, sedangkan Amoksisilin menggunakan KHM dari literatur (0.00902 mg/ml). Dari 3 kali pengulangan, 1 koloni ditemukan resisten terhadap dekok Rosella pada kelompok pengulangan ke-2 dengan rerata frekuensi resistensi sebesar $7,8 \times 10^{-12}$ mutasi per total populasi sel. Amoksisilin memiliki rerata frekuensi resistensi dari 3 kali pengulangan sebesar $1,2-1,8 \times 10^{-2}$ mutasi per total populasi sel. Data kemudian dilakukan uji analisa secara statistik dan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara pengaruh dekok Rosella dan Amoksisilin terhadap frekuensi resistensi bakteri *Enterococcus faecalis*.

Kesimpulan: Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan herbal Rosella sebagai obat tradisional, khususnya sebagai pengobatan antibakteri didapatkan memiliki frekuensi resistensi yang rendah. Hal ini dapat dibuktikan bahwa penggunaan Rosella dalam jangka pendek tidak menimbulkan resistensi.

Kata Kunci: Resistensi, Metode Luria-Delbrück, Frekuensi Resistensi, Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

The Resistance Frequency of *Enterococcus faecalis* Bacteria Against Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Decocta and Amoxicillin

Putri Lissanawidya*, Rio Risandiansyah**, Hardadi Airlangga**

*Student of the Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

**Lectures of the Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

Email: putrilissanawidy@yahoo.co.id

ABSTRACT

Introduction: The inappropriate use of antibiotics leads to antibiotic resistance. This can be supported by measuring resistance frequency of bacteria to antibiotics. Antibacterial activity is also found in many herbal medicines consumed as a traditional medicine, therefore resistance is suspected to occur in herbal medicine. This study aims to measure the frequency of resistance in *Enterococcus faecalis* applied to againts Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) decocta. The method used will also be applied to Amoxicillin as a control.

Method: Disc diffusion method was used to the measure inhibition zone (ZOI). Dilusion method used for minimum inhibition concentration (MIC). Resistance frequency was tested using Luria-Delbrück method, using 5 plates and 2 controls performed in 3 repetitions. Results were measured statistically using Mann Whitney U Test ($p \leq 0.05$).

Results: The ZOI from Rosella decocta and Amoxicillin was 20 mm at each concentration of 250 mg/ml and 200 mg/ml, respecticly MIC from Rosella decocta was 3,125 mg/ml, whereas Amoxicillin used the MIC from literature (0,00902 mg/ml). From 3 repetition, 1 coloni was found to be resistance to Rosella decocta on repetition 2 and the resistance frequency was $7,8 \times 10^{-12}$ mutant per total population cell. Amoxicillin was calculated the resistance

frequency from 3 repetition which was $1,2-1,8 \times 10^{-2}$ mutant per total population cell. The data was tested statistically and showed that there is a significant difference between the resistance frequency of *Enterococcus faecalis* towards Rosella decocta resistance and Amoxicillin resistance.

Conclusion: From this study it can be concluded that the use of Rosella herbal as a traditional medicine, especially for antibacterials has a low resistance frequency of mutation. Therefore, resistance to Rosella decocta cannot occurred in short term.

Keywords: Resistance, Luria-Delbrück Method, Resistance Frequency, Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn).

PENDAHULUAN

Resistensi antibiotik merupakan salah satu masalah kesehatan saat ini. Secara klinis, resistensi antibiotik mengakibatkan peningkatan kasus infeksi yang mengancam jiwa antara lain sepsis, demam dengan neutropenia dan meningitis bakterial¹. Hal ini terjadi karena penggunaan antibiotik tidak tepat dosis, tidak sesuai dengan penyakit yang diderita dan jangka waktu penggunaan yang tidak sesuai². Salah satu bakteri yang diketahui mengalami resistensi adalah *Enterococcus faecalis*. Bakteri ini diketahui telah resisten terhadap antibiotik golongan β -lactam yaitu ampicilin, amoksisilin, dan penisilin³.

Prosesmutasi dapat berlangsung secara induksi, kondisi ini dapat terjadi karena penggunaan dosis subinhibisi atau subletal. Contohnya pada penelitian terhadap bakteri *Streptococcus pneumonia* yang diketahui mengalami resistensi terhadap optochin setelah pemberian subinhibitory penicilin⁴. Selain itu, penggunaan dosis tinggi juga dapat meningkatkan frekuensi resistensi⁵.

Frekuensi resistensi memiliki satuan yang digunakan dalam pengukuran frekuensi resistensi yaitu jumlah bakteri mutan per jumlah total populasi bakteri. Kondisi ini merupakan kemampuan bakteri untuk menjadi resisten terhadap suatu antibakteri pada satu waktu⁶. Sementara itu, aktifitas antibakteri diketahui juga terdapat pada herbal yang sering digunakan dalam pengobatan tradisional dimasyarakat.

Dalam pengobatan tradisional, Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) merupakan salah satu tanaman herbal yang dapat digunakan sebagai peluruh air seni dan penurun panas⁷. Selain itu, Rosella merupakan tanaman yang diketahui memiliki efek antibakteri dan antioksidan⁸. Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada Rosella yang berperan sebagai obat antibakteri adalah asam malat, antosianin, saponin dan tannin⁹.

Penggunaan obat herbal Rosella sebagai antibakteri belum diketahui tingkat resistensinya. Selain itu, penelitian terkait frekuensi resistensi bakteri terhadap herbal juga belum pernah diteliti sebelumnya. Maka, pada penelitian ini akan dilakukan pengukuran frekuensi resistensi pada bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap dekok Rosella dengan antibiotik Amoksisilin sebagai kontrol. Hal

ini dilakukan untuk mengetahui keamanan penggunaan herbal sebagai antibakteri.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini akan dilaksanakan eksperimental laboratorium secara *in vitro*, untuk mengetahui frekuensi resistensi bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap dekok Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dan antibiotik Amoksisilin sebagai kontrol. Herbal yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Rosella yang didapatkan dari Balai Materia Medika Batu Malang dengan nomor determinasi 074/ 258/ 102.7/ 2017, kemudian dilakukan ekstraksi di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Pembuatan Dekok Rosella

Prosedur pembuatan dekok Rosella, dimulai dari mempersiapkan simplisia yang ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 20 g dan dicampur pelarut aquades sebanyak 200ml. Campuran simplisia dengan aquades diletakkan dalam wadah untuk dilakukan dekok selama ± 30 menit dengan suhu 90°C . Setelah itu, hasil dekok disaring dengan *vaccum Buchner* yang dilapisi oleh kertas saring sebanyak 3 lapis. Kemudian hasil filtrasi diletakkan pada oven dengan suhu 60°C selama 2 hari untuk mendapatkan ekstrak yang kering. Tahap terakhir ditambahkan 100 ml air steril untuk penggunaan selanjutnya.

Pembuatan Larutan Antibiotik Amoksisilin

Pembuatan larutan antibiotik Amoksisilin, dimulai dari mempersiapkan 2 buah kapsul Amoksisilin yang berisi 500 mg. Kemudian dicampur pelarut aquades steril sebanyak 100ml. Sehingga, menghasilkan konsentrasi sebesar 5 mg/ml. Tahap terakhir simpan dalam almari pendingin untuk penggunaan selanjutnya.

Strain dan Kultur Bakteri

Bakteri *Enterococcus faecalis* induk didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya yang diambil dari sample klinis. Bakteri tersebut ditumbuhkan pada media padat Nutrient Agar selama $\pm 18-20$ jam. NA yang digunakan mengandung 5 mg/ml *Peptone*, 3 mg/ml

Meat extract dan 12 mg/ml Agar. Kemudian diinokulasikan pada media cair Nutrient Broth selama \pm 18-20 jam. NB yang digunakan mengandung 5 mg/ml *Peptone*, 3 mg/ml *Meat extract*.

Kurva Standar Bakteri *Enterococcus faecalis*

Kurva standar dilakukan untuk menentukan jumlah koloni pada bakteri. Tahap awal dilakukan inokulasi bakteri *Enterococcus faecalis* yang diambil dari kultur pada media cair Nutrient Broth selama \pm 18-20 jam. Selanjutnya dihitung dengan menggunakan spektrofotometri untuk mendapatkan nilai OD₆₂₅ 0.8, 0.6 dan 0.4 .

Masing-masing konsentrasi diencerkan hingga 7x pengenceran. 100 μ l inokulasi diambil dan diratakan pada media padat Nutrient Agar, kemudian diinkubasi selama \pm 18-20 jam. Tahap akhir, dilakukan penghitungan koloni bakteri yang ada secara makroskopis dan dimasukkan hasil pada tabel kurva, dengan rumus sebagai berikut;

$$\text{Cfu/ml} = \frac{\sum \text{koloni} \times \text{faktor dilusi}}{\text{Volume inokulasi (ml)}}$$

Zona Inhibisi

Inokulasi bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan untuk zona inhibisi adalah OD₆₂₅=0,2. Pada uji ZOI inokulasi tersebut dicampur dengan media padat yaitu NA sebesar 1 % v/v. Kemudian, dilakukan *plating* dengan komposisi media setiap *plate* sebanyak 25 ml. Setelah media menjadi padat, dibuat lubang sumuran sebesar \pm 6mm setiap *plate*. Lalu dimasukkan 40 μ l setiap lubang sumuran dengan beberapa konsentrasi yang berbeda, yaitu 1%, 20%, 30%, 50%, 70%, 100% dan air aquades yang digunakan sebagai kontrol negatif. *Plate* kemudian diinkubasi selama \pm 18-20 jam dan dilakukan pengukuran zona bening menggunakan mistar.

Kadar Hambat Minimum

Pada uji KHM, inokulasi bakteri dengan konsentrasi awal 10⁸ atau setara OD₆₂₅=0,2 diencerkan sebanyak 20x. Hal ini supaya bakteri yang diujikan berjumlah 10⁶ Cfu/ml. Setelah itu, beberapa konsentrasi disiapkan untuk uji KHM yaitu 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 dan 1/512 dari konsentrasi induk, yakni 100 mg/ml. Uji KHM dilakukan menggunakan tabung reaksi dan media cair yaitu Nutrient Broth. Setiap tabung reaksi diisi dengan total volume 2 ml yang terdiri dari kultur bakteri dan konsentrasi herbal. Kemudian tabung reaksi diinkubasi selama \pm 18-20 jam dan dilakukan pengamatan batas kejernihan untuk menentukan kadar hambat minimum. Untuk Amoksisilin, KHM

yang digunakan adalah dari literatur penelitian sebelumnya yaitu sebesar 0,00902mg/ml¹⁰.

Frekuensi Resistensi

Pengukuran frekuensi resistensi pada penelitian ini menggunakan metode Luria-Delbrück. Inokulasi bakteri yang digunakan untuk tahap ini sama dengan inokulasi bakteri yang diujikan untuk menentukan KHM.

Tahap awal untuk seleksi bakteri mutan, dibuat campuran inokulasi bakteri dengan komposisi 1/4 KHM dari masing-masing perlakuan yang memiliki volume total sebanyak 500 μ l dengan pelarut Nutrient Broth. Kemudian diinkubasi selama \pm 48 jam.

Plate yang digunakan sebagai kontrol dibuat dari NA non selektif (tanpa pemberian Rosella maupun Amoksisilin) dan *Plate* untuk perlakuan digunakan NA selektif yang ditambahkan 2x KHM dari masing-masing perlakuan. Pada media tersebut, inokulasi bakteri sebanyak 500 μ l diratakan ke seluruh permukaan *plate*. Kemudian diinkubasi selama \pm 48 jam untuk proses seleksi bakteri yang mengalami resistensi¹¹. Hasil akhir dihitung dengan menggunakan metode P₀. Pada tahap ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Metode Penghitungan Frekuensi Resistensi

Metode ini merupakan metode sederhana untuk menghitung dan menggambarkan dari prinsip Luria-Delbrück. Prinsipnya adalah jumlah awal bakteri pada kultur harus sangat kecil, sehingga jumlah mutasi yang terjadi selama siklus pembelahan pertama dari bakteri adalah jumlah terkecil⁶. Rumus yang digunakan sebagai berikut;

$$f = Nm/N_0$$

untuk mengetahui frekuensi resistensi:

f = frekuensi resistensi

N_m = jumlah koloni yang mutasi

N_0 = jumlah koloni mula-mula

Metode ini kurang efisien jika digunakan pada penelitian dengan jumlah kultur yang banyak.

Metode Serial Passage

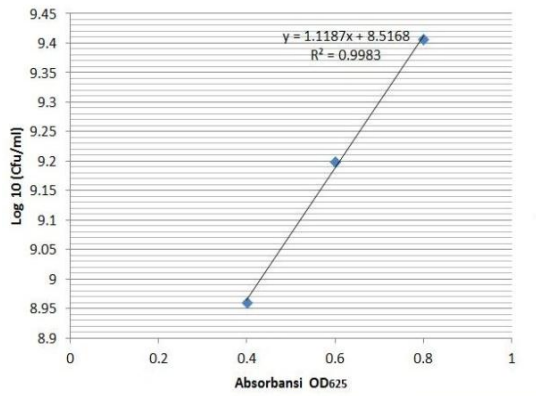
Metode ini dilakukan untuk mengetahui berapa kali kadar hambat minimum pada koloni bakteri yang mengalami resistensi¹².

Mula-mula dilakukan pengambilan koloni bakteri yang resisten pada *plate* NA selektif. Kemudian diinokulasikan pada media cair Nutrient Broth sebanyak 500 μ l dan diinkubasi selama \pm 18-20 jam untuk proses pertumbuhan bakteri mutan.

Plate untuk *serial passage* dibuat dari NA yang dicampur dengan 4x KHM dari Rosella. Setelah itu, inokulasi bakteri sebanyak 100 μ l diratakan pada

seluruh permukaan *plate*, lalu dilakukan inkubasi selama ± 18-20 jam.

HASIL
Hasil Kurva Standar Bakteri *Enterococcus faecalis*



Gambar 1. Kurva Standar bakteri *Enterococcus faecalis*.

Dari gambar kurva standar koloni bakteri *Enterococcus faecalis* didapatkan OD₆₂₅ = 0.2 yang digunakan untuk pengujian awal yaitu setara dengan 10⁸.

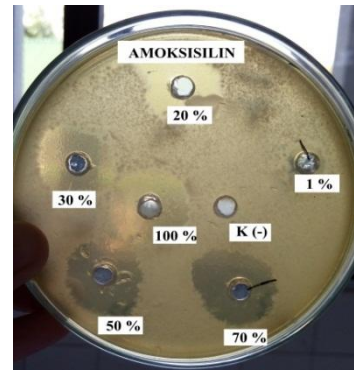
Hasil Zona Inhibisi

Hasil penelitian mengenai pengaruh dekok Rosella terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* memiliki zona inhibisi 20 mm pada konsentrasi 100%. Pada uji zona inhibisi ini dilakukan dalam beberapa konsentrasi, yang diperjelas dengan data penelitian pada tabel 1 sebagai berikut.

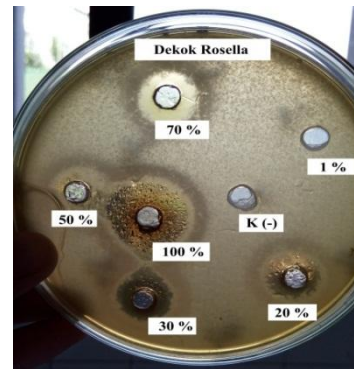
Tabel 1. Hasil Pengukuran Zona Inhibisi

No	Konsentrasi Perlakuan	Amoksisilin 0,2 g/ml (mm)	Rosella 250 mg/ml (mm)
1	Kontrol +	<6	<6
2	1%	10	<6
3	20%	12	12
4	30%	14	14
5	50%	16	16
6	70%	18	18
7	100%	20	20

Zona inhibisi yang diamati adalah zona bening pada sekitar lubang sumuran. Seperti yang ditunjukkan gambar 2 berikut ini.



A



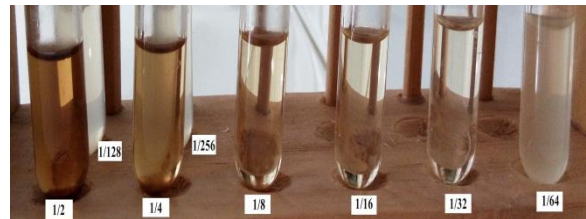
B

Gambar 2. Hasil Uji Zona Inhibisi; A. ZOI Amoksisilin; B. ZOI Dekok Rosella.

Dari gambar 2, dapat menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dekok Rosella maka semakin besar pula zona bening terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Dan semakin luasnya zona bening, dapat diketahui jika suatu zat memiliki efek yang kuat sebagai antibakteri.

Hasil Kadar Hambat Minimum Rosella

Kadar hambat minimum yang diujikan terhadap dekok Rosella ditunjukkan pada gambar 3 berikut.



adalah 1/32 yang setara dengan 3,125mg/ml.

Hasil Frekuensi Resistensi

Frekuensi resistensi pada bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap dekok Rosella dan Amoksisilin dapat dilihat pada tabel 2 berikut.

Tabel 2. Hasil Frekuensi Resistensi bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap dekok Rosella dan Amoksisilin.

No	Ket	Jml N _m	Jml N ₀	Frekuensi Resistensi (mutasi per total populasi sel)
1	R1	0	1,8 x 10 ¹⁰	zero mutation
2	R2	1	2,5 x 10 ¹⁰	7,8 x 10 ⁻¹²
3	R3	0	2,5 x 10 ¹⁰	zero mutation
4	A1	3,1 x 10 ¹⁰	2,2 x 10 ¹²	1,3 x 10 ⁻²
5	A2	3,4 x 10 ¹⁰	2,4 x 10 ¹²	1,2 x 10 ⁻²
6	A3	3,1 x 10 ¹⁰	1,6 x 10 ¹²	1,8 x 10 ⁻²

Keterangan :

R1 : Rosella perlakuan 1

R2 : Rosella perlakuan 2

R3 : Rosella perlakuan 3

A1 : Amoksisilin perlakuan 1

A2 : Amoksisilin perlakuan 2

A3 : Amoksisilin perlakuan 3

Dari tabel 2. Didapatkan hasil frekuensi resistensi tertinggi pada dekok Rosella, yaitu pada pengulangan ke-2 frekuensi sebesar 7,8 x 10⁻¹² mutasi per total populasi sel. Dan Amoksisilin menunjukkan frekuensi resistensi pada seluruh pengulangan dengan hasil sebesar 1,2-1,8 x 10⁻² mutasi per total populasi sel.

Uji normalitas data dilakukan dengan *shapiro willk* dan didapatkan nilai yang menunjukkan distribusi data tidak normal. Maka data selanjutnya dianalisis menggunakan uji Mann Whitney U test dan didapatkan nilai $p < 0.05$ ($p < 0.05$). Dari hasil analisa tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara pengaruh dekok Rosella dan Amoksisilin terhadap frekuensi resistensi bakteri *Enterococcus faecalis*.

Hasil Serial Passage

Uji percobaan *serial passage* pada 1 koloni yang mengalami resistensi pada 2x KHM telah ditumbuhkan pada konsentrasi 4x KHM dan dilakukan inkubasi selama ± 18-20 jam.

Hasil yang didapatkan adalah tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri yang mengalami resistensi pada media selektif dengan konsentrasi 4x KHM dekok Rosella.

PEMBAHASAN

Daya Hambat Dekok Rosella dan Amoksisilin sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis*.

Dari tabel 1, zona inhibisi terbesar didapatkan pada konsentrasi 100% untuk masing-masing perlakuan yaitu sebesar 20 mm. Dan zona hambat terkecil pada dekok Rosella yaitu sebesar 12 mm terdapat pada konsentrasi 20%, sedangkan Amoksisilin sebagai kontrol memiliki zona hambat terkecil sebesar 10 mm dengan konsentrasi 1%.

Hasil zona inhibisi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dekok Rosella maka semakin tinggi pula daya hambat terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Pengenceran 1% dekok Rosella diketahui sudah tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*, hal ini dimungkinkan karena kandungan senyawa kimia sebagai antibakteri yang terdapat pada Rosella terlalu sedikit.

Berdasarkan hasil uji KHM menggunakan dekok Rosella terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* didapatkan hasil kadar hambat pada konsentrasi 1/32 yang setara dengan 3,125 mg/ml. Pada penelitian sebelumnya juga telah dilakukan pengamatan pada kadar hambat minimum pada bakteri Gram positif yaitu *S. aureus* dan *S. epidermidis* yang memiliki KHM masing-masing 5 mg/ml dan 0,625 mg/ml¹³. Perbedaan konsentrasi untuk menghambat bakteri pada Gram positif ini dapat dispekulasi oleh faktor mekanisme pertahanan dari bakteri terhadap senyawa antibakteri tersebut.

KHM Amoksisilin diambil dari literatur karena terdapat persamaan karakteristik bakteri dan pengambilan sampel bakteri yang diujikan, yaitu bakteri Gram positif bentuk *coccus* yang diperoleh dari sampel isolate klinis. Hasil dari KHM ini akan selanjutnya digunakan untuk perlakuan pada tahap frekuensi resistensi.

Frekuensi Resistensi Bakteri *Enterococcus faecalis* Terhadap Dekok Rosella dan Amoksisilin sebagai Antibakteri

Pada hasil frekuensi resistensi dekok Rosella didapatkan hanya 1 koloni yang mengalami resistensi pada 3 kali pengulangan. Sedikitnya jumlah koloni yang mengalami resistensi juga dapat dimungkinkan karena Rosella memiliki kandungan senyawa kuat yang berperan sebagai antibakteri yaitu antosianin yang merupakan jenis dari flavonoid, saponin, dan tannin^{7,9}. Senyawa yang terdapat pada Rosella tersebut memiliki efek antibakteri yang berbedabeda.

Antosianin merupakan salah satu jenis flavonoid, yang juga merupakan senyawa fenolik⁹. Senyawa ini diketahui bersifat disinfektan yang mempunyai mekanisme antibakteri dengan cara mendenaturasi protein. Sehingga, akan menyebabkan metabolisme sel terhenti dan menyebabkan kematian pada bakteri¹⁴.

Selain itu, senyawa saponin juga merupakan senyawa antibakteri yang terdapat pada Rosella. Senyawa saponin dikenal sebagai “*surfactant agent*” karena memiliki sifat seperti sabun. Mekanisme antibakteri saponin adalah dengan cara merusak permukaan sel. Hal ini yang kemudian akan mengakibatkan tidak seimbang permeabilitas atau dapat terjadi kebocoran pada membran sel. Sehingga, komposisi esensial yang dibutuhkan oleh bakteri untuk kehidupannya hilang dan dapat menyebabkan kematian sel bakteri¹⁵.

Senyawa lain yang juga diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri pada Rosella adalah tanin. Mekanisme tanin sebagai antibakteri adalah membentuk ikatan dengan protein sehingga terjadi koagulasi protoplasma bakteri. Mekanisme ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan dari bakteri dan menyebabkan kematian pada bakteri tersebut¹⁶.

Hal ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya, yang menyebutkan bahwa kombinasi antibiotik yang digunakan pada pengobatan TB memiliki tingkat resistensi yang rendah. Pemberian obat TB dengan antibiotik Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol dan Steptomycin memiliki laju mutasi sebesar $1,0 \times 10^{-7}$ – $2,2 \times 10^{-10}$ mutasi per pembelahan sel¹⁷. Dengan kombinasi pemberian antibiotik akan membuat bakteri lebih sulit menjadi resisten karena perbedaan mekanisme kerja untuk membunuh bakteri.

Dari semua senyawa kimia yang berperan sebagai antibakteri, telah diketahui mempunyai mekanisme kerja pada tiga lokasi yang berbeda untuk membunuh bakteri. Kondisi seperti ini yang dimungkinkan dapat menyebabkan bakteri lebih sulit untuk mengalami resistensi, karena bakteri harus mempunyai mekanisme resistensi yang bekerja secara bersamaan untuk mengeluarkan senyawa antibakteri tersebut. Namun, 1 koloni yang ditemukan resisten terhadap dekok Rosella kemungkinan memiliki mekanisme resistensi untuk Rosella.

Frekuensi resistensi bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap antibiotik Amoksisilin sebagai kontrol didapatkan sebesar $1,2-1,8 \times 10^{-2}$ mutan per total populasi sel. Hal ini dapat dimungkinkan karena bakteri telah mengalami resistensi pada antibiotik golongan β -lactam, yang pada penelitian ini menggunakan antibiotik Amoksisilin.

Antibiotik Amoksisilin diketahui mempunyai mekanisme kerja pada satu lokasi saja untuk membunuh bakteri, yaitu dengan cara menghambat biosintesa pada dinding sel. Amoksisilin akan membentuk ikatan cincin β -lactam pada dinding sel bakteri, sehingga akan mengganggu proses multiplikasi dan permeabilitas bakteri¹⁸. Sementara itu, pada bakteri juga telah diketahui memiliki mekanisme resistensi untuk antibiotik golongan β -lactam yaitu dengan cara memproduksi enzim β -lactamase yang akan memecah ikatan cincin β -lactam dengan dinding sel bakteri sehingga antibiotik menjadi tidak efektif¹⁹.

Resistensi pada Amoksisilin juga dapat terjadi akibat penggunaan yang tidak rasional. Menurut penelitian sebelumnya, antibiotik di Indonesia dijual secara bebas di apotek mana saja, serta dapat dibeli tanpa resep dokter. Dan telah diketahui bahwa Amoksisilin merupakan lini pertama untuk penyakit infeksi^{10,20}. Hal ini yang dimungkinkan dapat mempengaruhi tingginya frekuensi resistensi terhadap amoksisilin pada penelitian ini.

Pada tahap pengujian *serial passage* tidak didapatkan adanya pertumbuhan bakteri resisten. Kondisi ini dapat disebabkan oleh karena sedikitnya koloni awal yang mengalami resistensi dan kandungan senyawa kimia sebagai antibakteri yang kuat pada Rosella. Sehingga, sampel bakteri yang telah mengalami resistensi pada konsentrasi 2x KHM tidak dapat tumbuh pada konsentrasi 4x KHM.

KESIMPULAN

Rosella diketahui memiliki daya hambat yang kuat terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*, dengan zona hambat yang dimiliki sebesar 20 mm dan KHM yang didapatkan adalah sebesar 3,125 mg/ml. Selanjutnya, pada tahap laju mutasi pengulangan ke-2 didapatkan frekuensi mutasi sebesar $7,8 \times 10^{-12}$ mutasi per total populasi sel. Hasil ini termasuk sangat rendah, sehingga dapat membuktikan bahwa penggunaan Rosella dalam jangka panjang tidak akan menyebabkan terjadinya resistensi secara cepat.

Hasil yang berbeda didapatkan pada frekuensi resistensi Amoksisilin yaitu sebesar $1,2-1,8 \times 10^{-2}$ mutasi per total populasi sel. Kondisi ini yang memungkinkan resistensi terjadi sangat tinggi pada antibiotik ini, sehingga perlu pengawasan dalam penggunaan antibiotik tersebut.

SARAN

Untuk penelitian selanjutnya, perlu dikaji lebih mendalam terkait mekanisme resistensi pada bakteri terhadap herbal Rosella dan perubahan gen yang mengalami mutasi sehingga dapat menyebabkan resistensi pada bakteri *Enterococcus faecalis*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kepada Allah dan Orang tua yang selalu memberikan kesempatan dan dukungan doa dalam mengerjakan penelitian ini sebagai tugas akhir. Terimakasih Aris Widodo, Shinta Kusumawati dan Noer Aini yang telah membantu diskusi dalam penyusunan jurnal ini dan IOM FK UNISMA yang memberikan bantuan finansial dalam penelitian ini. Terimakasih EIJKMAN Institute yang telah memberikan kesempatan untuk mempresentasikan poster penelitian pada 6th EIJKMAN International Symposium Conference.

REFERENSI

- Utami, E. R. Antibiotika, Resistensi dan Rasionalitas Terapi, *Saintis*. 2012. **1**(1): 124-138.
- Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 08 Tahun 2015 tentang Program Pengendalian Resistensi Antimikroba di Rumah Sakit. Jakarta. 2015.
- Imaniah, B. *Peta Kuman dan Resistensinya terhadap Antibiotika pada Penderita ISK (Infeksi Saluran Kemih) di RSUD Dr. Moewardi pada tahun 2014*, Surakarta. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2015
- Cortes, P. R., Pinas. G. E., Orio, A. G. A., & Echenique, J. R. Subinhibitory concentrations of penicillin increase the mutation rate to optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. 2008. 973-977.
- Gustafsson, I., Sjolund, M., Torrel, E., Johannesson, M., Engstrand, L., Cars, O., & Andersson, D. I. Bacteria with increased mutation frequency and antibiotic resistance are enrich in the commensal flora of patients with high antibiotic usage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. **52**: 645-650.
- Pope, C. F., Sullivan, D. M. O., Mchugh, T. D., & Gillespie, S. H. MINIREVIEW A Practical Guide to Measuring Mutation Rates in Antibiotic Resistance. 2008. **52**(4): 1209-1214.
- Rais, I. R., & Kaewnopparat, S. Antibakteri Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Thailand dan Indonesia pada Bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. *Prosiding Seminar Nasional dan Workshop "Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik IV" tahun 2014*. 2014. hal 220-207.
- Fullerton, M., Khatiwada, J., Johnson, J. U., Davis, S., & Williams, L. L. Determination of Antimicrobial Activity of Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Esherichia coli* O157:H7 Isolated from Food, Veterinary, and Clinical Samples. *Journal of Medicinal Food*. 2011. **14**(9): 950-956.
- Jung, E., Kim, Y., & Joo, N. Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013. **93**(15): 3769-3776.
- Putri, O. Y. K., Abrori, C., & Astuti, I. S. W. Sensitivity Test of Amoxicillin and Erytromycin against Secondary Infections from Acute Respiratory Infection Specimens. *E-Journal Pustaka Kesehatan*. 2015. **3**(1):18-23.
- Gould, C. V., Sniegowski, P.D., Shchepetov, M., Metlay, J. P., & Weiser, J.N. Identifying Mutator Phenotypes among Fluoroquinolone-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae* Using Fluctuation Analysis. *American Society for Microbiology*. 2007. **51**(9): 3225-3229.
- Wang, G. E., Trevor, J.M., Wilson., Jiang, O., & Taylor, D. E. Spontaneous Mutations That Confer Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *American Society for Microbiology*. 2001. **45**(3): 727-733.
- Chomnawang, T. M., Surassmo, S., Nukoolka, V. S., & Gritsanapan, W. Antimicrobial Effect of Thai Medicinal Plants Against Acne-inducing Bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. (101):330-333.
- Komala, O., Rosyanti, R., & Muztabadihardja. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Air Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap Bakteri *S.pneumoniae*. Bogor. *Program Studi FMIPA*. 2013. hal 73-78.
- Miranti, M., Prasetyorini., & Suwary,C. Perbandingan Efektifitas Antibakteri Ekstrak Etanol 30% dan 96% Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Ekologia*. 2013. **13**(1): 9-18.
- Estri, R., & Anggarbeni, S., R. Uji Daya Hambat Air Rebusan Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap Bakteri *E.coli*. Kediri. *Jurnal Wiyata*. 2015.**2**(1).
- Mcgrath, M., Gey van pittius, N. C., Van helden, P. D., Warren, R. M., & Warner, D. F. Mutation rate and the emergence of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014. **69**(2): 292-302.
- Kaur, S. P., Rao, R., & Nanda, S. Amoxicillin : a Broad Spectrume Antibiotic. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciens*. 2011. **3**(3). ISSN- 0975-1491.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzener, T. A. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*, 26th Edition. 2013. Lange Medical Book.

20. Grayson, M., L. Kucer's The Use of Antibiotic:
A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal,
Antiparasitic and Antiviral Drugs, 6th edition.

Taylor & Francis Group, LLC. 2010. ISBN 13:
978-1-4441.