

MODULASI AKTIVITAS CIPROFLOXACIN TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* OLEH N-ASETILSISTEIN DAN VITAMIN C

Dini Agustina¹, Laksmi Indreswari², Farmitalia Nisa Trisianti³, Kardiana Izza El Milla³, Bagus Hermansyah⁴, Septa Surya Wahyudi², Jauhar Firdaus⁵

¹ Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

² Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³ Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember

⁴ Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

⁵ Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Submitted : April 2020

Accepted : July 2020

Published : September 2020

ABSTRAK

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi yang sulit diobati dengan terapi obat tunggal karena tingkat keberhasilan yang rendah serta kecenderungan menjadi resisten selama pemberian obat tunggal. Salah satu antibiotik yang digunakan adalah ciprofloxacin. Untuk meningkatkan sensitivitas *P. aeruginosa* terhadap ciprofloxacin, kombinasi N-asetilsistein atau vitamin C mungkin diperlukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi antara N-asetilsistein dan ciprofloxacin serta antara vitamin C dan ciprofloxacin terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*. Penelitian ini menggunakan uji difusi cakram yang berisi kombinasi konsentrasi ciprofloxacin konstan 1mg/ml dengan N-asetilsistein dalam berbagai konsentrasi 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, dan 20mg/ml dan vitamin C dengan 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; dan konsentrasi 40 mg/ml. Dalam kombinasi antara N-asetilsistein dan ciprofloxacin, peningkatan sensitivitas *P. aeruginosa* terjadi pada konsentrasi 10ml/mg pada kombinasi obat, dan dalam kombinasi antara vitamin C dan ciprofloxacin, peningkatan sensitivitas *P. aeruginosa* terjadi pada konsentrasi 2, 5 ml/mg pada kombinasi obat di atas kontrol positif. Regresi logaritmik mengungkapkan konsentrasi minimal N-asetilsistein dan vitamin C masing-masing adalah 9,593 mg/ml dan 1,9 mg/ml dapat meningkatkan sensitivitas *P. aeruginosa* pada ciprofloxacin. Dapat disimpulkan bahwa N-asetilsistein dan vitamin C meningkatkan aktivitas ciprofloxacin untuk menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa in vitro*.

Kata kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, Ciprofloxacin, N-asetilsistein, Vitamin C

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of the infectious bacteria that is difficult to treat with single-drug therapy because of the low success rate and the tendency to become resistant during single drug administration. One of the antibiotics used is ciprofloxacin. Increasing the sensitivity of *P. aeruginosa* to ciprofloxacin, a combination of N-acetylcysteine or ascorbic acid may be needed. This study aims to determine the effect of a combination of N-acetylcysteine and ciprofloxacin as well as between ascorbic acid and ciprofloxacin on the growth of *P. aeruginosa*. This study uses a disk diffusion test that contains a combination of a constant concentration of ciprofloxacin 1mg / ml with N-acetylcysteine in various concentrations of 1.25mg / ml, 2.5mg / ml, 5mg / ml, 10mg / ml, and 20mg / ml and ascorbic acid with 2.5 mg / ml; 5 mg / ml; 10 mg / ml; 20 mg / ml; and a concentration of 40 mg / ml. In a combination of N-acetylcysteine and ciprofloxacin, an increase in sensitivity of *P. aeruginosa* occurs at a concentration of 10ml / mg in a drug combination, and in a combination of ascorbic acid and ciprofloxacin, an increase in sensitivity of *P. aeruginosa* occurs at a concentration of 2.5 ml/mg in a drug combination in over positive control. Logarithmic regression revealed a minimum concentration of N-acetylcysteine and ascorbic acid, respectively of 9,593 mg/ml and 1.9 mg/ml could increase the sensitivity of *P. aeruginosa* to ciprofloxacin. It can conclude that N-acetylcysteine and ascorbic acid increase the activity of ciprofloxacin to inhibit the growth of *P. aeruginosa in vitro*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Ciprofloxacin, Ascorbic acid, N-acetylcysteine

Korespondensi: dini_agustina@unej.ac.id

Pendahuluan

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri nomor satu yang menyebabkan infeksi nosokomial pneumonia pada pengguna ventilator.¹ Bakteri ini dapat bertahan hidup di air dan tanah sehingga seringkali menyebabkan infeksi yaitu keratitis, osteomielitis, otitis dan infeksi pada luka bedah dan luka bakar, yang dapat menghasilkan nanah hijau kebiruan.²

Salah satu obat aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* yaitu Ciprofloxacin yang merupakan golongan kuinolon.³ Fluoroquinolon merupakan obat spektrum luas dan bekerja dengan memblok sintesis DNA bakteri sehingga dapat mencegah proses transkripsi dan replikasi normal bakteri.⁴ Namun berdasarkan data dari US National Surveillance pada tahun 2001 hingga 2006 dilaporkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap antibiotik ciprofloxacin sebesar 41%-44%.⁵ Hal tersebut disebabkan oleh karena terbentuknya biofilm dan efflux pump.⁶

Biofilm dan efflux pump diprakarsai oleh terbentuknya Reactive Oxygen Species (ROS) yang dihasilkan oleh piosianin *Pseudomonas aeruginosa*

yang berinteraksi dengan oksigen molekuler.⁷ Keberadaan oksigen reaktif tersebut dapat ditanggulangi oleh antioksidan yaitu vitamin C.⁸ Dalam penelitian sebelumnya didapatkan bahwa vitamin C memiliki efek sebagai antibiofilm dan anti efflux pump.^{9,10} Selain itu vitamin C telah terbukti dapat meningkatkan aktivitas antibiotik kloramfenikol dan levofloxacin.^{11,12}

Selain ascorbic acid, N-asetilsistein memiliki juga efek penghambatan pada produksi biofilm dan memiliki kemampuan untuk mengeradikasi pembentukan awal (pre-formed) biofilm.¹³ Kombinasi kedua obat tersebut dapat memungkinkan bahwa kombinasi agen antibiofilm dan antimikrobal akan menjadi sinergis.¹⁴ 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.¹⁵

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kombinasi dari N-asetilsistein dan ascorbic acid terhadap aktivitas ciprofloxacin dalam pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan *quasi experimental design*.¹⁶ Sampel penelitian menggunakan isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan stok kultur dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Sampel dibagi dalam 12 kelompok dimana dua kelompok merupakan kelompok kontrol negatif yang berisi akuades dan kontrol positif yang berisi Ciprofloxacin 1mg/ml, 5 kelompok lainnya merupakan perlakuan kombinasi Ciprofloxacin konsentrasi tetap 1mg/ml dengan vitamin C berbagai konsentrasi 2.5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml dan 40 mg/ml dan 5 kelompok lainnya merupakan perlakuan kombinasi ciprofloxacin konsentrasi tetap 1mg/ml dengan N-asetilsistein berbagai konsentrasi 1.25mg/ml, 2.5mg/ml,

5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml. Penelitian menggunakan uji *disc diffusion*.

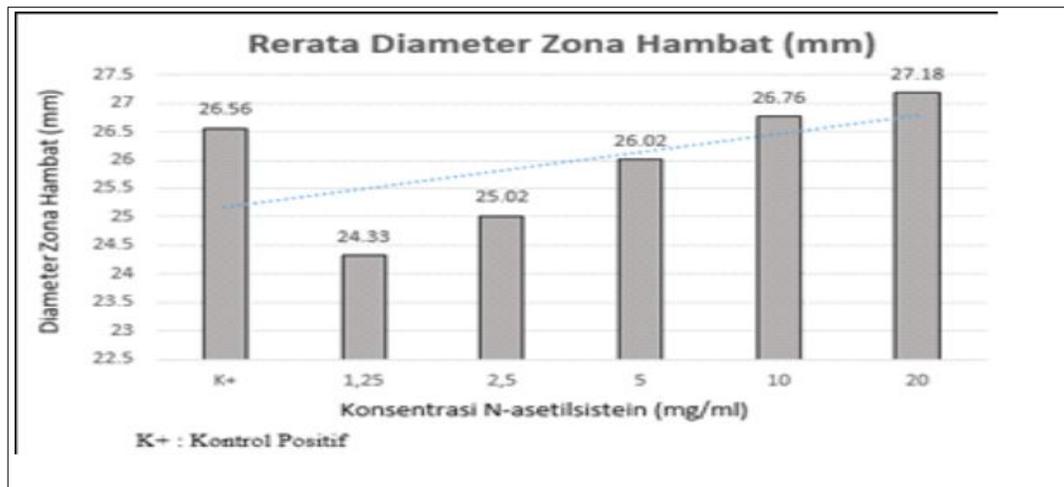
Cakram kertas dibuat dari *Whatman Filter Paper* yang telah tersterilisasi. Setelah cakram kertas ditetesi dengan larutan obat, selanjutnya cakram kertas ditempelkan pada *Muller Hinton Agar* yang telah diinokulasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-20 jam. Penghambatan pertumbuhan bakteri berupa zona hambat bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. dengan 4 kali pengulangan dan diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong kemudian hasil dirata – rata.¹⁷

Analisis data menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* lalu dilihat homogenitas data menggunakan uji *Lavene's*. Untuk melihat hubungan antara efek pemberian kombinasi obat dengan diameter zona hambat menggunakan uji korelasi *Pearson* dan dilanjutkan menggunakan uji regresi logaritmik untuk mengetahui konsentrasi terkecil vitamin C dan N-asetilsistein yang mampu mempengaruhi pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. Sedangkan untuk mengetahui perbedaan antara kombinasi ciprofloxacin dan vitamin c

dan kombinasi ciprofloxacin dan N-asetilsistein dilakukan uji *t-test*.¹⁸

Hasil Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan hasil yang ditunjukkan oleh Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Diagram batang rerata diameter zona hambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dengan pemberian ciprofloxacin dan N-asetil sistein (Sumber: Koleksi Pribadi)

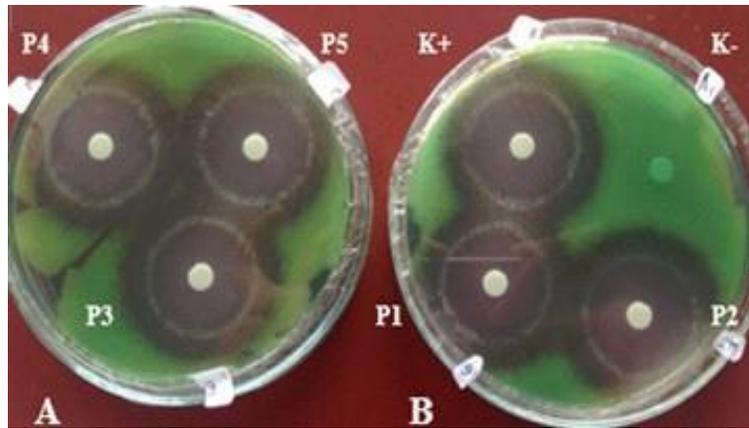
Gambar 1 dan 2 menunjukkan diameter zona hambat yang terbentuk pada penambahan N-asetil sistein. Diameter zona hambat yang ditunjukkan dengan zona bening pada media (Gambar 2) menunjukkan bahwa terhambatnya pertumbuhan bakteri oleh N-asetilsistein kombinasi dengan ciprofloxacin secara in vitro. Semakin meningkat konsentrasi N-asetilsistein maka semakin lebar zona hambat yang dihasilkan. Berdasarkan hasil rerata

didapatkan pada konsentrasi N-asetilsistein 10 mg/ml terjadi kenaikan di atas kontrol positif ciprofloxacin 1mg/ml.

Hasil Penambahan vitamin C terhadap aktivitas Ciprofloxacin dalam penghambatan pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan diameter zona hambat yang terbentuk paling besar adalah pada kelompok dengan penambahan vitamin C 40mg/ml, dengan diameter zona

hambat rata-rata 27,75mm. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif zona hambat merupakan diameter cakram kertas yaitu 5 mm. Pada kelompok kontrol positif didapatkan rata-rata sebesar 22,56mm sedangkan perlakuan 1 hingga 4 didapatkan diameter zona hambat rata-rata sebesar 23,06;

23,98; 25,72; 26,43; dan 27,75mm. Diameter zona hambat pada kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan sesuai dengan peningkatan konsentrasi vitamin C. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan gambaran hasil pada penambahan N-asetilsistein.



Gambar 2. Diameter zona hambat kelompok kontrol dan perlakuan Diameter zona hambat pada media *Mueller Hinton agar*. Keterangan: K+ (ciprofloxacin), K- (akuades), P1; P2; P3; P4; P5 (ciprofloxacin + N- asetilsistein 1,25mg/ml; 2,5mg/ml; 5mg/ml; 10mg/ml; 20mg/ml). (Sumber: Koleksi Pribadi)

Hasil uji korelasi pearson pada modulasi vitamin C menunjukkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara variabel bebas dan variabel terikat dengan arah korelasi positif dan sangat kuat, artinya semakin besar konsentrasi vitamin C yang diberikan maka dapat meningkatkan diameter zona hambat *P.aeruginosa* pada MHA. Persamaan regresi logaritmik adalah

$Y=21,458+1,707\ln(X)$ dengan nilai X adalah C 1,9 mg/ml, sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi minimal vitamin C yang dapat meningkatkan aktivitas ciprofloxacin terhadap penghambatan pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebesar 1,9 mg/ml.

Hasil uji statistik *Pearson* pada modulasi dengan N-asetilsistein

didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,625 ($p > 0,05$) menunjukkan terdapat hubungan yang bermakna antara diameter zona hambat dengan kelompok penelitian. Pada uji regresi logaritmik didapatkan persamaan $Y = 24,134 + 1,073 \ln X$. Didapatkan nilai X adalah 9,593 yang berarti secara kuantitatif konsentrasi N-asetilsistein pada 9,593 mg/ml mulai meningkatkan sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* terhadap ciprofloxacin dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Pembahasan

Kelompok kontrol negatif pada kedua modulasi tidak menimbulkan zona hambat menunjukkan bahwa metode yang dilakukan benar. Rata-rata diameter zona hambat pada kontrol positif modulasi vitamin C dan N-asetilsistein berturut-turut adalah 22,56 mm dan 26,56. Hal tersebut menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan pada penelitian ini sensitif terhadap antibiotik ciprofloxacin berdasarkan CLSI (>21 mm)¹⁷. Namun pada beberapa kasus didapatkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* mulai resisten terhadap banyak agen antimikrobal dikarenakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki sifat mudah

menjadi resisten terhadap semua antibiotik setelah pemberian terapi antibiotik inisial atau pemberian terapi jangka panjang sehingga terapi ciprofloxacin pada *Pseudomonas aeruginosa* diperlukan zona diameter yang lebih besar untuk mencegah terjadinya kegagalan terapi akibat resistensi^{17,19}. Oleh karena itu untuk menghindari terjadinya resistensi maka ditambahkan vitamin C atau N-asetilsistein yang dapat meningkatkan aktivitas antibiotik ciprofloxacin yang ditunjukkan dengan meningkatnya zona hambat seiring bertambahnya konsentrasi dari kedua zat tersebut.

Konsentrasi terkecil vitamin C yang menunjukkan adanya peningkatan zona hambat *Pseudomonas aeruginosa* dalam penelitian ini adalah 2,5mg/ml sedangkan dari uji regresi logaritmik dapat ditentukan konsentrasi vitamin C terkecil yang mampu meningkatkan sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* adalah 1,9mg/ml. Kedua hasil tersebut berbeda dengan referensi yang menyatakan bahwa potensi vitamin C sebagai antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 5-20mg/ml.¹⁰

Peningkatan kerja antibiotik oleh vitamin C disebabkan oleh sifat antioksidan vitamin C tersebut. Vitamin C sebagai antioksidan memiliki kemampuan mentransfer elektron superoksida dan hidrogen peroksida yang berada pada permukaan bakteri. Hidrogen peroksida merupakan bahan pembentukan biofilm yaitu DNA eksterna yang dapat menurunkan penyerapan ciprofloxacin menuju target kerjanya. Saat tidak ada oksidan pada permukaan bakteri maka tidak ada sinyal pembentukan DNA eksterna yang selanjutnya membentuk biofilm. Selain dalam pembentukan biofilm, vitamin C juga berperan sebagai perusak biofilm yang terbentuk dengan cara melepaskan ikatan biofilm dari substrat^{7,8,9,20}.

Vitamin C juga dapat berperan sebagai inhibitor *efflux pump* mulai pada konsentrasi 10 mg/ml. *Efflux pump* pada *Pseudomonas aeruginosa* yang sensitif terhadap ciprofloxacin adalah MexAB-OPRM dan MexXY. Keduanya berperan dalam penghilangan protein yang dapat merespon stres lingkungan yang didapat dari antibiotik. Proses tersebut diperantarai oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yakni superoksida yang

memperkaya faktor *efflux pump* sehingga mengawali proses oksidasi dari polipeptida bakteri normal menjadi bentuk protein menyimpang yang tidak peka antibiotik¹⁰.

Tidak jauh berbeda dengan hasil dari penambahan vitamin C, pada penambahan N-asetilsistein juga menunjukkan peningkatan diameter zona hambat. Gambar 1 pada konsentrasi 10mg/ml mulai terjadi peningkatan diameter zona hambat sedangkan dari uji regresi logaritmik dapat ditentukan konsentrasi minimal yang mampu meningkatkan sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* adalah 9,593mg/ml. Dari beberapa penelitian didapatkan bahwa konsentrasi hambat minimum dari N-asetilsistein mampu mengurangi sintesis biofilm sebesar 60% dan pengurangan jumlah sel untuk pembentukan biofilm pada konsentrasi 2 dan 4 mg/ml. Namun terdapat penelitian lain yang menyatakan bahwa konsentrasi hambat minimum N-asetilsistein untuk isolat *Pseudomonas aeruginosa* berada pada konsentrasi 10mg/ml sampai 40mg/ml, seperti halnya pada penelitian Zhao (2010) terjadi kenaikan diameter zona hambat kelompok perlakuan yang melebihi

kontrol positif mulai pada konsentrasi N-asetilsistein 10mg/ml. Pada diagram batang menunjukkan adanya peningkatan diameter zona hambat seiring penambahan konsentrasi N-asetilsistein. Hal tersebut menandakan bahwa penambahan N-asetilsistein dalam kombinasi meningkatkan kepekaan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap ciprofloxacin sehingga pertumbuhannya dapat terhambat^{13,15}.

Kombinasi dari N-asetilsistein dan ciprofloxacin memiliki efek sinergis (50%) atau efek antagonis (50%) terhadap strain *P. aeruginosa*, sehingga selain mampu meningkatkan kepekaan terhadap antibiotik kombinasi tersebut juga dapat menurunkannya. Pada penelitian ini efek penurunan muncul pada penambahan N-asetilsistein dengan konsentrasi kecil yaitu 1,25mg/ml-5mg/ml. Penurunan kepekaan bakteri terjadi karena sifat antioksidan dari N-asetilsistein yang menjadi sumber sistein untuk sintesis intraseluler dari glutation. Sifat antioksidan terutama pada pembentukan glutation inilah yang mempengaruhi kerja antibiotik ciprofloxacin yang menstimulasi induksi dari reaktif oksigen spesies (ROS) pada beberapa spesies bakteri. Glutation/GSH

ini berperan dalam proteksi terhadap stres lingkungan termasuk syok osmotik, keasaman, proteksi terhadap toksin, dan stres oksidatif. Sebagai contoh glutation memberi bakteri untuk proteksi penting terhadap ciprofloxacin dan fluoroquinolon lainnya^{15,21,22,23}.

Pemberian kombinasi N-asetilsistein dengan ciprofloxacin bagus diberikan ketika sudah terbentuk biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini dikarenakan ciprofloxacin mampu menembus biofilm *Pseudomonas aeruginosa* namun gagal untuk membunuh bakteri. Ketebalan biofilm berhubungan dengan toleransi antibiotik dikarenakan keterbatasan oksigen yang membatasi aktivitas metabolik bakteri. Gradasi oksigen merupakan kebutuhan pada biofilm dan terdapat beberapa bukti pada literatur bahwa kondisi anaerob mengantagoniskan aksi antibiotik melawan *Pseudomonas aeruginosa*. Dari sifat ciprofloxacin itu maka terapi akan lebih baik diberi kombinasi seperti N-asetilsistein yang memiliki kemampuan untuk mengurangi atau menghambat aderens bakteri dan mengganggu pematangan biofilm dengan cara menurunkan produksi matriks ekstraseluler polisakarida (EPS)^{24,25}.

Simpulan dan Saran

Kesimpulan dari penelitian ini adalah N-asetilsistein dan vitamin C meningkatkan aktivitas ciprofloxacin dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*, dengan konsentrasi minimal N-asetilsistein dan vitamin C masing-masing adalah 9,593 mg/ml dan 1,9 mg/ml. Semakin tinggi konsentrasi N-asetilsistein dan vitamin C, semakin menghambat pertumbuhan bakteri. Saran untuk mengembangkan penelitian ini adalah perlu dilakukan uji secara *in vivo* menggunakan hewan coba.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu kelancaran penelitian ini, terutama untuk Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Daftar Pustaka

1. Tyas MW, Suprpti B, Hardiono, Widodo A. 2013. Analysis of antibiotic use in ventilator associated pneumonia. *Folia Medica Indonesia*. 43(3):168-172.
2. Johnson AG, Ziegler RJ, Hawley L. 2011. Essensial mikrobiologi dan imunologi edisi kelima. Tangerang: Bina Rupa Aksara.
3. Setiabudy R. 2011. Golongan kuinolon dan flurokuinolon dalam farmakologi dan terapi edisi 5. Jakarta: Badan Penerbitan FKUI.
4. Gilman AG. 2008. Goodman&Gilman Dasar Farmako Terapi Volume 2. Jakarta: ECG medica l Publisher.
5. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 22(4):582-610.
6. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. 2014. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*. 4: 422.
7. Das T dan Manefield M. 2012. Pyocianin promotes ekstracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLos One*. 7(10):1-7.
8. Packer L, Traber MG, Kraemer K, Frei B. 2002. The antioxidant of vitamin C & E. Illinois: ACCS Press.
9. Abbas H, Serry F, El-Marsy E. 2012. Combating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with potential biofilm inhibitor. *Asian Journal Pharma*. 2(2): 66-72.

10. Serry MF, El-Marsy EM, Shaker G, Abbas H. 2008. The role of haemolysin transport system in antimicrobial resistance of haemolytic strains of *Escherichia coli* and the effect of potential efflux pump inhibitors. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2(2):307-318.
11. Abbas H. 2012. Modulation of antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa* by N-acetylcysteine, ambroxol and ascorbic acid. *Asian Journal Pharma*. 2(4):123-128.
12. Gebaly E, Essam T, Hashem S, El-Baky RA. 2012. Effect of levofloxacin and vitamin c on bacterial adherence and performed biofilm on uretral catheter surface. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 4(16): 131-136.
13. El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, El- Baky ARM, Gad GF. 2009. Effect of ciprofloxacin and n-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on uretral stent surface. *Polish Journal of Microbiology*. 58(3): 261 -267.
14. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. 2003. N- acetyl-L- cysteine affemasicts growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol*. 69: 4814-4822.
15. Zhao T. 2010. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*. 10:140
16. Hanafiah KA. 2012. Rancangan percobaan: teori dan aplikasi. Jakarta: Rajawali Press.
17. CLSI (Clinical and Laboratory Standar Institute). 2012. Performance standards for antimicrobial suscepibility test aproved standard eleventh edition. 32 (1):48-60.
18. Dahlan MS. 2009. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta: Salemba Medika.
19. Brooks GF, Butel JS, Carroll KC, Morse SA, Mietzner TA. 2013. Medical Microbiology. 26th ed. New York: Lange Medical Book/McGraw- Hill.
20. Grant GD, Zhang TT, Cloyne LS, Perkins AV, Kiefel MJ, Dukie AD. 2010. Exogeneous Pyocianin alters *Pseudomonas aeruginosa* Suscepibility to siprofloksasin. *American Journal of Microbiology*. 2010; 1(1):9-13
21. Emami MH, Zobeiri M, Rahimi H, Arjomandi F, Daghagzadeh H, Adibi P, et al. 2014. N-acetyl cysteine as an adjunct to standard anti- *Helicobacter pylori* eradication regimen in patients with dyspepsia: A prospective randomized, open-label trial. *Advanced Biomedical Research*.
22. Moon JH, Jang EY, Shim KS, Lee JY. 2015. In vitro Effects of N-acetylcysteine alon and in combination Alt antibiosis on *Prevotella intermedia*. *Journal of Microbiology*. 53 (5): 321-329.
23. Masip L, Veeravalli K, Georgiou G. 2006. The Many Faces of Glutatione in Bacteria. *Antioxid. Redox Signal*. 8: 753-762.
24. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. 2003. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to

- Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(1):317-323.
25. Pézer GC, Rodriguez BA, Moran FJ, Hurtado C, Blanco MT, Gomez GAC. 1997. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *S. epidermidis*. *J.Antimicrob. Chemother.* 39: 643-646.