

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan bakteri gram-positif, berbentuk bulat (kokus), dan bersifat aerob fakultatif. Dalam kondisi normal, bakteri ini dapat berperan sebagai flora normal tubuh. *S. aureus* umumnya tidak menimbulkan infeksi pada kulit yang sehat karena sistem kekebalan tubuh mampu mencegah kolonisasi bakteri tersebut. Namun, jika dibiarkan masuk ke aliran darah atau jaringan internal kulit, *S. aureus* dapat menyebabkan berbagai macam infeksi dan bertindak sebagai patogen pada saat sistem imun tubuh melemah.

Saat ini, infeksi bakteri *S. aureus* merupakan salah satu masalah kesehatan yang masih menjadi tantangan besar dalam dunia medis. Prevalensi infeksi akibat *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) menunjukkan rentang antara 25%-65%, dengan rata-rata nasional sebesar 38% (Syaniar, 2024). Menurut Kemenkes RI pada tahun 2022, sekitar 1,27 juta kematian disebabkan oleh resistensi antimikroba dan diperkirakan mencapai 10 juta kematian pada tahun 2050 dan akan terus meningkat (Kemenkes RI, 2023).

Pada infeksi *S. aureus*, salah satu pilihan utama pengobatan adalah penggunaan antibiotik penisilin spektrum luas seperti amoksisilin. Amoksisilin adalah obat antimikroba β -laktam. β -laktam bekerja dengan mengikat protein pengikat penisilin, menghambat transpeptidase dalam sintesis dinding sel yang melibatkan ikatan silang, sehingga mengaktifkan enzim autolitik di dinding sel bakteri, yang mengakibatkan lisis dan kerusakan sel bakteri (Akhavan *et al.*, 2023). Siahaan (2022) melaporkan bahwa dari hasil penelitian yang melibatkan 16 kabupaten di 8 provinsi, amoksisilin menempati posisi sebagai antibiotik yang paling sering diresepkan, baik dalam pelayanan kesehatan primer maupun di rumah sakit, menjadikannya antibiotik dengan tingkat penggunaan tertinggi di Indonesia. Namun, terdapat resistensi yang tinggi terhadap amoksisilin (Siahaan *et al.*, 2022). Sebagian besar negara, strain *S. aureus* telah mengembangkan resistensi terhadap antibiotik amoksisilin, akibat produksi enzim penisilinase. Resistensi ini menyebabkan antibiotik tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri meskipun diberikan dalam dosis



rusnya efektif (Muntasir *et al.*, 2022). Sehingga, diperlukan meningkatkan aktivitas antibakteri amoksisilin.

ntibiotik dapat dicegah dengan menggunakan bahan yang tkan efektivitas amoksisilin, seperti vitamin C. Vitamin C berfungsi sebagai antioksidan kuat yang dapat menetralkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) serta memberikan efek

imunomodulator yang mendukung sistem kekebalan tubuh (Abdelraheem *et al.*, 2022). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa vitamin C memiliki aktivitas antibakteri yang efektif, baik ketika digunakan secara tunggal maupun dalam kombinasi dengan antibiotik. Studi secara *in vitro* melaporkan bahwa pada konsentrasi rendah 150 µg/mL, vitamin C mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* (Mousavi *et al.*, 2019). Selain itu, penelitian lain menunjukkan konsentrasi vitamin C yang efektif untuk menghambat pertumbuhan sekitar 70% isolat *E. coli* adalah 1.250 µg/mL. Vitamin C juga menunjukkan efek sinergis dengan sebagian besar antibiotik seperti levofloxacin, meropenem, ceftazidime, dan nitrofurantoin, yang dapat meningkatkan potensi terapi antibakteri tanpa menunjukkan efek antagonis (Hassuna *et al.*, 2023). Sinergitas menunjukkan interaksi antara dua atau lebih agen antimikroba yang menghasilkan efek kombinasi lebih besar daripada efek masing-masing agen secara individu, sehingga meningkatkan efektivitas terapi dalam mengatasi resistensi antibiotik (Altarawneh *et al.*, 2024).

Hingga saat ini, belum terdapat penelitian mengenai pengaruh kombinasi vitamin C dan amoksisilin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Hal ini yang mendasari perlunya dilakukan penelitian mengenai efek sinergitas antibakteri kombinasi vitamin C dan amoksisilin terhadap bakteri *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana efek sinergitas kombinasi antara amoksisilin dan vitamin C terhadap pertumbuhan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini, yaitu:

1. Mengetahui efek sinergitas kombinasi antara amoksisilin dan vitamin C terhadap pertumbuhan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *biological safety cabinet* (Thermo Scientific™ 1300 Series A2), inkubator (Memmert®), oven (Memmert UN55®), autoklaf (All American Model 25x-2®), *cell culture plate* 96-well (Biologix®), densitometer (Biosan®), timbangan analitik (Ohaus®), mikropipet (Memmert®), *micropipet multichannel* (Nichiryo®), *water bath* (Memmert®), vortex mixer (Gemmy® type VM-300), dan alat-alat gelas kimia (Pyrex®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vitamin C (Emsure®), serbuk amoksisilin (Asian®), bakteri MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) diperoleh dari HUMRC (Hasanuddin University Medical Research Center), *mueller-hinton broth* (Himedia®), dan reagen 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Merck®).

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat kaca yang tidak memiliki skala dan peralatan yang terbuat dari logam disterilkan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1 jam. Alat-alat kaca yang berskala, serta peralatan yang terbuat dari plastik dan karet disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit (Wulandari *et al.*, 2021).

2.2.2 Pembuatan Medium *Mueller-Hinton Broth* (MHB)

Medium MHB sebanyak 1,05 gram ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL air steril. Larutan kemudian dipanaskan menggunakan *water bath*. Setelah itu, medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.3 Peremajaan Bakteri

Peremajaan isolat bakteri MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) dilakukan menggunakan medium NA dengan cara ambil satu ose bakteri lalu digoreskan pada agar miring. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



Suspensi Bakteri Uji

SA disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL hingga kekeruhan setara dengan larutan standar 0,5 asi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Selanjutnya, suspensi bakteri tak 0,1 mL ke dalam 9,9 mL NaCl 0,9% steril sehingga $1,5 \times 10^6$ CFU/mL (Hassuna *et al.*, 2023).

2.2.5 Pembuatan Larutan Stok Amoksisilin

Larutan stok amoksisilin disiapkan dengan melarutkan 20 mg amoksisilin dalam 10 mL air steril, sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok sebesar 2.000 µg/mL. Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi 1.000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, dan 31,25 µg/mL (Rudiansyah *et al.*, 2021).

2.2.6 Pembuatan Larutan Stok Vitamin C

Larutan stok vitamin C disiapkan dengan melarutkan 480 mg vitamin C dalam 10 mL air steril, sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok sebesar 48.000 µg/mL. Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi 24.000 µg/mL, 12.000 µg/mL, 6.000 µg/mL, 3.000 µg/mL, 1.500 µg/mL, dan 750 µg/mL (Mousavi *et al.*, 2019; Hassuna *et al.*, 2023).

2.2.7 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Tunggal Amoksisilin

Penentuan KHM amoksisilin dilakukan dengan metode mikrodilusi pada mikroplat 96-well. Sebanyak 160 µL medium MHB dimasukkan ke dalam setiap sumur mikroplat, lalu ditambahkan dengan 20 µL dari setiap pengenceran konsentrasi amoksisilin (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, dan 31,25 µg/mL) dan bakteri uji MRSA sebanyak 20 µL, sehingga setiap sumur berisi total 200 µL. Selanjutnya, mikroplat diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Setelah inkubasi, seluruh sumur ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 5 µL dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian, mikroplat diamati secara visual untuk melihat adanya perubahan warna menjadi merah. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak adanya perubahan warna merupakan nilai KHM amoksisilin.

2.2.8 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Tunggal Vitamin C

Penentuan KHM vitamin C dilakukan dengan metode mikrodilusi pada mikroplat 96-well. Sebanyak 160 µL medium MHB dimasukkan ke dalam setiap sumur mikroplat, lalu ditambahkan dengan 20 µL dari setiap pengenceran konsentrasi vitamin C (12.000 µg/mL, 6.000 µg/mL, 3.000 µg/mL, 1.500 µg/mL, dan 750 µg/mL) dan bakteri uji MRSA sebanyak 20 µL, sehingga setiap sumur berisi total 200 µL. Selanjutnya, mikroplat diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Setelah inkubasi, seluruh sumur ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 5 µL dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian, mikroplat diamati secara visual untuk melihat adanya perubahan warna menjadi merah. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak adanya perubahan warna merupakan nilai KHM vitamin C.



Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kombinasi Vitamin C dan Amoksisilin

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk kombinasi vitamin C

dan amoksisilin dilakukan menggunakan metode microdilution checkerboard assay pada mikroplat 96-well. Setiap sumur memiliki volume total 200 μL , yang terdiri dari 10 μL vitamin C, 10 μL amoksisilin, 20 μL bakteri uji MRSA, dan dilengkapi dengan 160 μL MHB. Vitamin C memiliki lima variasi konsentrasi, yaitu 12.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dan 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sedangkan amoksisilin memiliki lima variasi konsentrasi, yaitu 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dan 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Populasi bakteri uji yang digunakan adalah $1,5 \times 10^6$ CFU/mL. Kontrol eksperimen meliputi kontrol vitamin C (20 μL vitamin C + 180 μL MHB), kontrol amoksisilin (20 μL amoksisilin + 180 μL MHB), kontrol bakteri (20 μL bakteri + 180 μL MHB), kontrol pelarut (20 μL air steril + 20 μL bakteri + 160 μL MHB), serta kontrol medium (200 μL MHB). Mikroplat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, setiap sumur ditambahkan 5 μL larutan TTC 1% dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 25°C. Perubahan warna larutan dalam setiap sumur diamati secara visual. Sumur yang tidak mengalami perubahan warna menjadi merah menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. KHM ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah di sumur yang tidak mengalami perubahan warna.

2.2.10 Penentuan Nilai Indeks Konsentrasi Hambat Fraksional (FICI) Kombinasi Vitamin C Dengan Amoksisilin

Penentuan nilai Indeks Konsentrasi Hambat Fraksional (*Fractional Inhibitory Concentration Index/FICI*) kombinasi vitamin C dengan amoksisilin menurut persamaan berikut (Hassuna *et al.*, 2023).

$$\text{FIC}_A(\text{Amoksisilin}) = \frac{\text{KHM amoksisilin kombinasi vitamin C}}{\text{KHM amoksisilin}} \quad (1)$$

$$\text{FIC}_B(\text{Vitamin C}) = \frac{\text{KHM vitamin C kombinasi amoksisilin}}{\text{KHM vitamin C}} \quad (2)$$

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = (C_A/\text{MIC}_A) + (C_B/\text{MIC}_B) \quad (3)$$

Interaksi *in vitro* antara agen antibakteri ditentukan melalui perhitungan menggunakan rumus *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI). Berdasarkan hasil perhitungan, efek yang dihasilkan dapat diklasifikasikan sebagai berikut: interaksi dinyatakan sinergis jika nilai FICI $\leq 0,5$; aditif jika nilai FICI $> 0,5$ atau ≤ 1 ; indifferen jika nilai FICI > 1 atau ≤ 4 ; serta antagonis jika nilai FICI > 4 (Hassuna *et al.*, 2023).

2.2.11 Analisis data, pembahasan, dan Kesimpulan



kan dengan menghitung *Fractional Inhibitory Concentration* sil perhitungan ini digunakan untuk membahas dan aksi antara amoksisilin dengan vitamin C.