

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Streptococcus mutans merupakan mikrobiota normal pada rongga mulut manusia yang dapat mengakibatkan pembentukan karies gigi, abses, hingga infeksi kardiovaskular (Lemos *et al.*, 2019). Penggunaan antibiotik seperti amoksisilin dapat dilakukan untuk menangani infeksi akibat bakteri ini (F. M. Abdullah *et al.*, 2024). Namun, telah ditemukan banyak kasus resistensi *S. mutans* terhadap amoksisilin. Lamooki *et al.* (2023) melaporkan sekitar 80% tingkat resistensi *S. mutans* terhadap amoksisilin. Oleh karena itu, diperlukan strategi yang efektif dalam menangani bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik (Kumar *et al.*, 2022).

Penggunaan modulator antimikroba merupakan salah satu strategi untuk menangani resistensi antibiotik. Kombinasi antibiotik dengan modulator dapat memodulasi antibiotik sehingga meningkatkan aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Modulasi ditentukan dengan membandingkan konsentrasi hambat minimum (KHM) antibiotik tunggal dengan KHM antibiotik bersama modulator pada konsentrasi subinhibitor untuk memperoleh nilai faktor modulasi. Modulasi dikatakan signifikan apabila nilai faktor modulasi (FM) ≥ 4 atau terjadi pengurangan empat kali lipat pada KHM antibiotik (Coelho *et al.*, 2015). Efek kombinasi antimikroba dapat juga dilihat melalui nilai *fractional inhibitory concentration index* (FICI) berupa interaksi yang sinergis, *indifference*, atau antagonis. Terapi kombinasi antimikroba dianggap efektif terhadap mikroorganisme apabila menghasilkan efek yang sinergis (Enders *et al.*, 2008). Telah banyak laporan mengenai kombinasi agen antimikroba yang berupa senyawa atau campuran senyawa dalam menghasilkan efek sinergis dan secara signifikan mampu meningkatkan kerentanan bakteri terhadap antibiotik (Mérillon & Riviere, 2018).

Salah satu senyawa yang pernah dilaporkan berpotensi untuk dikombinasikan dan berperan sebagai modulator antibiotik adalah asam askorbat (vitamin C) (Liang *et al.*, 2022). Asam askorbat seringkali diresepkan oleh dokter sebagai suplemen nutrisi dan diberikan pada sejumlah besar pasien penyakit infeksi (Abdelraheem *et al.*, 2022; Hemilä, 2017). Asam askorbat telah dilaporkan memiliki efek antibakteri dan dapat memodifikasi aktivitas antimikroba dari berbagai antibiotik (Mumtaz *et al.*, 2023). Hasil penelitian Eydou *et al.* (2020) menunjukkan bahwa asam askorbat memiliki efek negatif terhadap pertumbuhan *S. mutans*. Terdapat pula penelitian oleh El-Banna *et al.* (2024) yang menunjukkan bahwa kombinasi antibiotik



misin dengan vitamin C memiliki efek sinergis yang signifikan untuk bakteri *Staphylococcus aureus*. Efek yang dapat kombinasi antimikroba bervariasi dengan kombinasi yang berbeda setiap mikroorganisme sehingga tidak ada kombinasi yang umum (Riedel *et al.*, 2019). Hingga saat ini, belum ada yang dapat meningkatkan aktivitas antibakteri kombinasi amoksisilin dengan asam

askorbat sebagai modulator terhadap *S. mutans*. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri kombinasi amoksisilin dengan asam askorbat terhadap *S. mutans* secara *in vitro*.

I.2 Rumusan Masalah

1. Apakah penambahan asam askorbat dapat memodulasi aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap *S. mutans*?
2. Bagaimana pengaruh kombinasi amoksisilin dan asam askorbat terhadap pertumbuhan *S. mutans*?

I.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah penambahan asam askorbat dapat memodulasi aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap *S. mutans*
2. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi amoksisilin dan asam askorbat terhadap pertumbuhan *S. mutans*.



BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yakni *microplate* 96 wells, mikropipet (Dragonlab[®]), inkubator (Mettler[®]), McFarland densitometer (Biosan[®]), autoklaf (All American Model 25X-2[®]), oven (Ecocell[®]), kompor listrik (Oxone[®]), *biosafety cabinet* (Thermo[®]), timbangan analitik (Ohaus[®]), vortex *mixer* (Gemmy VM-300[®]) dan alat gelas lainnya.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni amoksisilin, asam askorbat (Merck[®]), biakan *Streptococcus mutans* ATCC 25175, reagen *Triphenyltetrazolium chloride* (TTC) (Himedia[®]), medium *Mueller Hinton Broth* (Himedia[®]), medium *Nutrient Agar* (Merck[®]), *aquadest* (Waterone[™]), dan larutan NaCl 0,9% (Otsu[®]).

II.2 Metode Kerja

II.2.1 Sterilisasi alat

Alat-alat yang tahan terhadap pemanasan suhu tinggi seperti peralatan gelas disterilisasi menggunakan oven selama 2 jam pada suhu 160°C. Alat-alat yang tidak tahan terhadap pemanasan tinggi seperti plastik serta alat gelas berskala disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Trihadiningrum, 2021).

II.2.2 Penyiapan medium

Medium *Nutrient Agar* (NA) ditimbang sejumlah 1 g lalu dilarutkan dalam 50 mL *aquadest*. Kemudian, medium dipanaskan hingga jernih. Keasaman medium disesuaikan pada rentang pH 6,8 ± 0,2. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (S. S. Abdullah *et al.*, 2021).

Medium *Mueller Hinton Broth* (MHB) ditimbang sejumlah 1,05 g lalu dilarutkan dalam 50 mL *aquadest*. Keasaman medium disesuaikan pada rentang pH 7,3 ± 0,1. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (S. S. Abdullah *et al.*, 2021).

II.2.3 Penyiapan bakteri uji



Peremajaan bakteri *S. mutans* dilakukan dengan menggoreskan bakteri niring dan diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. bakteri dilakukan dengan memindahkan biakan *S. mutans* yang dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% steril. homogenkan dengan vortex *mixer* lalu disesuaikan dengan 0,5 atau setara dengan 1,5 x 10⁸ CFU/mL. Suspensi biakan dengan mencuplik sebanyak 100 µL suspensi biakan 1,5 x 10⁸

CFU/mL ke dalam tabung reaksi berisi 9,9 mL larutan NaCl 0,9% steril sehingga diperoleh densitas biakan 10^6 CFU/mL.

II.2.4 Pembuatan larutan uji amoksisilin

Amoksisilin ditimbang sebanyak 4 mg lalu dilarutkan menggunakan *aquadest* hingga volume larutan mencapai 5 mL dengan konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya, larutan stok amoksisilin diencerkan menggunakan *aquadest* hingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 320 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, dan 10 $\mu\text{g/mL}$.

II.2.5 Pembuatan larutan uji asam askorbat

Asam askorbat ditimbang sebanyak 500 mg lalu dilarutkan menggunakan *aquadest* hingga volume larutan mencapai 5 mL dengan konsentrasi 100.000 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya, larutan uji diencerkan kembali dengan *aquadest* hingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 50.000 $\mu\text{g/mL}$, 25.000 $\mu\text{g/mL}$, 12.500 $\mu\text{g/mL}$, 6.250 $\mu\text{g/mL}$, dan 3.125 $\mu\text{g/mL}$.

II.2.6 Uji KHM

Penentuan nilai konsentrasi hambat minimum dilakukan menggunakan metode mikrodilusi cair pada *microplate* 96 *wells* dengan volume total pada setiap sumuran 200 μL . Penentuan KHM amoksisilin tunggal dilakukan dengan mengisi setiap sumuran dengan 160 μL medium MHB lalu diikuti dengan 20 μL masing-masing konsentrasi larutan uji dan 20 μL suspensi bakteri. Konsentrasi akhir larutan uji amoksisilin dalam sumuran adalah 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, dan 1 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan densitas akhir biakan dalam sumuran adalah 10^5 CFU/mL. Penentuan KHM asam askorbat tunggal dilakukan menggunakan metode yang sama dengan konsentrasi akhir larutan uji asam askorbat dalam sumuran adalah 5.000 $\mu\text{g/mL}$, 2.500 $\mu\text{g/mL}$, dan 1.250 $\mu\text{g/mL}$, 625 $\mu\text{g/mL}$, dan 312,5 $\mu\text{g/mL}$.

Penentuan KHM kombinasi amoksisilin dan asam askorbat terhadap *S. mutans* dilakukan dengan mengisi setiap sumuran dengan 160 μL medium MHB diikuti dengan 10 μL masing-masing konsentrasi larutan uji amoksisilin dan asam askorbat. Kemudian, sumuran diisi dengan 20 μL suspensi biakan *S. mutans* sehingga densitas akhir biakan dalam sumuran adalah 10^5 CFU/mL. Konsentrasi akhir larutan uji amoksisilin dalam sumuran adalah 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, dan 1 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan konsentrasi akhir larutan uji asam askorbat adalah 5.000 $\mu\text{g/mL}$, 2.500 $\mu\text{g/mL}$, dan 1.250 $\mu\text{g/mL}$, 625 $\mu\text{g/mL}$, dan 312,5 $\mu\text{g/mL}$. Setiap sumuran yang kosong diisi dengan kontrol medium (200 μL medium MHB), 200 μL MHB, 20 μL *aquadest* steril, dan 20 μL suspensi biakan *S. mutans* (180 μL MHB dan 20 μL masing-masing konsentrasi larutan uji amoksisilin), kontrol asam askorbat (180 μL MHB dan 20 μL masing-masing konsentrasi larutan uji asam askorbat), kontrol kombinasi amoksisilin dan



asam askorbat (180 μ L MHB dan 10 μ L masing-masing konsentrasi larutan uji amoksisilin, dan 10 μ L masing-masing konsentrasi larutan uji asam askorbat), serta kontrol biakan (180 μ L MHB dan 20 μ L suspensi biakan *S. mutans*).

Microplate diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, seluruh sumuran ditetesi dengan reagen TTC 1% sebanyak 5 μ L dan dibiarkan selama 30 menit. Nilai KHM ditandai dengan konsentrasi terendah dari larutan uji yang tidak mengalami perubahan menjadi warna merah pada setiap sumuran (Saviano & Lourenço, 2018).

II.2.7 Penentuan nilai faktor modulasi (FM)

Faktor modulasi merupakan rasio dari KHM antibiotik tunggal dengan KHM kombinasi antibiotik bersama modulator (Kuete, 2023). Faktor modulasi ditentukan dengan membandingkan KHM amoksisilin tunggal dengan KHM kombinasi amoksisilin bersama asam askorbat pada konsentrasi subinhibitor sebagai modulator. Nilai faktor modulasi dikatakan signifikan apabila nilai FM \geq 4 (Coelho *et al.*, 2015). Nilai faktor modulasi dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$FM = \frac{\text{KHM antibiotik}}{\text{KHM antibiotik+modulator}} \quad (\text{Kumar } et al., 2022)$$

II.2.8 Penentuan nilai *fractional inhibitory concentration index* (FICI)

Nilai *fractional inhibitory concentration index* dapat digunakan untuk menentukan karakteristik dari kombinasi antimikroba. Nilai FICI dapat dihitung menggunakan rumus di bawah ini dengan A sebagai amoksisilin dan B sebagai asam askorbat (Leber, 2016).

$$FICI = \frac{\text{KHM A dengan penambahan B}}{\text{KHM A}} + \frac{\text{KHM B dengan penambahan A}}{\text{KHM B}} \quad (\text{Leber, 2016})$$

Nilai FICI yang diperoleh dapat diinterpretasikan sebagai berikut:

Tabel 1. Interpretasi nilai FICI (Leber, 2016)

Nilai FICI	Interaksi
$\leq 0,5$	Sinergis
$0,5 < FICI \leq 4,0$	<i>Indifference</i>
$> 4,0$	Antagonis

II.3 Analisis data, pembahasan, dan kesimpulan



Data yang diperoleh dari penelitian akan dianalisis dan dibahas kemudian