

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Resistensi antimikroba (AMR) merupakan salah satu dari 10 ancaman kesehatan global terbesar menurut WHO, dengan prevalensi infeksi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) di Indonesia mencapai rerata 38% (Izati *et al.*, 2024; Fanila *et al.*, 2025). MRSA menjadi ancaman serius karena resistensi terhadap hampir semua antibiotik beta-laktam yang dimediasi oleh gen *mecA*, sehingga meningkatkan risiko komplikasi berat hingga kematian (Anggraini *et al.*, 2021; WHO, 2022). Kondisi ini mendesak adanya inovasi terapi baru karena laju penemuan antibiotik baru tidak sebanding dengan cepatnya perkembangan resistensi (WHO, 2024).

Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah penggunaan bahan alam, salah satunya teh hijau. Teh hijau kaya akan polifenol, seperti *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate* (ECG), *epicatechin* (EC), *gallocatechin* (GC) dan *gallocatechin gallate* (GCG). *Epigallocatechin gallate* (EGCG) yang memiliki aktivitas antibakteri yang kuat melalui penghambatan enzim esensial bakteri (Wang *et al.*, 2022; Ismiyatin *et al.*, 2025). Efektivitas ini didukung oleh berbagai penelitian *in vitro* yang melaporkan nilai KHM ekstrak teh hijau terhadap MRSA pada rentang 400 µg/mL- 600 µg/mL dengan diameter zona hambat berkisar antara 17 mm hingga 19,130 ± 0,250 (Radji *et al.*, 2013; Sartini *et al.*, 2020; Hussein *et al.*, 2023).

Namun, aplikasi klinis EGCG terhambat oleh stabilitas yang buruk, diketahui bahwa katekin dapat mengalami degradasi yang signifikan, dalam larutan, katekin cepat terdegradasi melalui auto-oksidasi, yang melibatkan hilangnya atom hidrogen, pembentukan intermediat radikal semiquinon, superoksida dan pembentukan produk teroksidasi kuinon (Krupkova *et al.*, 2016). Bahkan, penelitian lain melaporkan bahwa konsentrasi tertinggi EGCG dalam plasma hanya setara dengan 0,012% dari jumlah asupan yang dikonsumsi (Grosso *et al.*, 2024; Dai *et al.*, 2020; Afifah *et al.*, 2024). Secara *in vitro*, rendahnya bioavailabilitas EGCG dikonfirmasi melalui simulasi pencernaan yang menunjukkan bahwa kadar EGCG bebas hanya tersisa kurang dari 10% pada kondisi pH usus karena degradasi yang cepat (Dai *et al.*, 2020).

Katekin khususnya EGCG memiliki aktivitas antibakteri (Afifah *et al.*, 2024). Salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas antibakteri dari EGCG ialah dengan menggunakan agen modulator salah satu contohnya ialah vitamin C (Mousavi *et al.*, 2019). Vitamin C tidak hanya berfungsi sebagai antioksidan yang menekan laju degradasi EGCG secara signifikan tetapi juga berperan dalam mempertahankan stabilitas kimia EGCG (Rahman *et al.*, 2019).

Meskipun potensi individu dari teh hijau dan efek sinergis Vitamin C telah dipelajari, penelitian yang secara spesifik mengevaluasi kombinasi keduanya terhadap MRSA masih sangat terbatas. Sebagian besar studi sinergisme sebelumnya masih berfokus pada bakteri Gram-negatif (Peters *et al.*, 2010). Adanya celah penelitian ini menjadi dasar bagi peneliti untuk menginvestigasi efek modulasi dan potensi sinergisme kombinasi ekstrak teh hijau dan Vitamin C terhadap MRSA secara *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi landasan ilmiah bagi pengembangan terapi kombinasi berbasis bahan alam yang efektif dalam menghadapi tantangan infeksi MRSA.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah Vitamin C dapat meningkatkan aktivitas antibakteri ekstrak teh hijau terhadap pertumbuhan MRSA secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Mengevaluasi efek Vitamin C dalam meningkatkan aktivitas antibakteri ekstrak teh hijau dalam menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Autoclave (All American Model 25x-2®), *Biological safety cabinet* (Thermo Scientific™ 1300 Series A2), densitometer (*Biosam*®), *incubator* (Mettler®), kertas pH (*Merck*®), mikropipet (Mettler®), *Microplate* 96-well (*Biologix*®), oven (Mettler UN55®), seperangkat alat gelas (*Pyrex*®), timbangan analitik (*Sartorius*®), *vortex mixer* (Gemmy®), *water bath* (Mettler®), dan alat-alat gelas lainnya.

2.2.2 Bahan

Asam askorbat (vitamin C), *aquadest sterile* (Otsuka®), dimetil sulfoksida (DMSO) (*Merck*®), ekstrak etanol teh hijau (koleksi Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt.), medium tryptic soy agar (TSA) (*Merck*®), medium mueller-hinton broth (MHB) (*Merck*®), bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 (*Thermo fisher*®) dan NaCl 0,9% (*Otsuka*®).

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Sterilisasi alat

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

2.3.2 Pembuatan medium

2.3.2.1 Pembuatan medium *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Medium TSA ditimbang sebanyak 0,4 g dan dilarutkan dalam 10 mL *aquadest*. Medium TSA kemudian dipanaskan menggunakan *water bath* untuk melarutkan. Setelah itu, medium TSA disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.3.2.2 Pembuatan medium *Mueller-Hinton Broth* (MHB)

Medium MHB ditimbang sebanyak 2,1 g dan dilarutkan dalam 100 mL *aquadest*. Setelah itu, medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.3.2.3 Pembuatan medium *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Medium MHA ditimbang sebanyak 3,8 g dan dilarutkan dalam 100 mL *aquadest*. Setelah itu, medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.3.3 Penyiapan larutan stok uji

2.3.3.1 Pembuatan larutan stok ekstrak teh hijau

Larutan stok ekstrak teh hijau (20.000 µg/mL) disiapkan dengan melarutkan 100 mg ekstrak dalam 5 mL dimetil sulfoksida (DMSO). Larutan konsentrasi 16.000 µg/mL dibuat dengan mengambil 4 mL larutan stok dan menambahkannya dengan 1 mL air steril. Selanjutnya, larutan 8.000 µg/mL dibuat dengan mengambil 2,5 mL larutan 16.000 µg/mL dan menambahkannya dengan 2,5 mL air steril. Prosedur pengenceran bertingkat 1:1 (2,5 mL larutan sebelumnya + 2,5 mL air steril) ini dilanjutkan untuk memperoleh seri konsentrasi 4.000 µg/mL, 2.000 µg/mL, 1.000 µg/mL, dan 500 µg/mL.

2.3.3.2 Pembuatan larutan stok vitamin C

Larutan stok vitamin C (8.000 µg/mL) disiapkan dengan cara melarutkan 40 mg vitamin C dalam 5 mL air steril. Selanjutnya, larutan 4.000 µg/mL dibuat dengan mengambil 2,5 mL larutan 8.000 µg/mL dan menambahkannya dengan 2,5 mL air steril. Prosedur pengenceran bertingkat 1:1 (2,5 mL larutan sebelumnya + 2,5 mL air steril) ini dilanjutkan untuk memperoleh seri konsentrasi 2.000 µg/mL, 1.000

µg/mL, dan 500 µg/mL.

2.3.4 Penyiapan bakteri uji

2.3.4.1 Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* resisten-metisilin (MRSA) menggunakan medium TSA dilakukan dengan cara ambil satu ose bakteri MRSA lalu digoreskan pada agar miring, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

2.3.4.2 Pembuatan suspensi bakteri

Kultur bakteri *Staphylococcus aureus* resisten-metisilin (MRSA) disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl 0,9% steril hingga kekeruhan setara dengan larutan standar 0,5 McFarland (densitas $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Selanjutnya, suspensi bakteri diencerkan sebanyak 1 mL ke dalam 9 mL NaCl 0,9% steril sehingga diperoleh densitas $1,5 \times 10^7$ CFU/mL. Selanjutnya, suspensi bakteri diencerkan sebanyak 1 mL ke dalam 9 mL medium MHB steril sehingga diperoleh densitas $1,5 \times 10^6$ CFU/mL (Hassuna *et al.*, 2023).

2.3.5 Uji sensitivitas bakteri MRSA

Uji sensitivitas bakteri MRSA dilakukan untuk memastikan karakteristik resistensi bakteri uji sebelum digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Uji sensitivitas dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan antibiotik cefoxitin sebagai antibiotik indikator resistensi metisilin. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan berdasarkan pedoman *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), di mana isolat *Staphylococcus aureus* dinyatakan resisten terhadap metisilin apabila diameter zona hambat cefoxitin yang terbentuk ≤ 21 mm.

2.3.6 Pengukuran pH tunggal dan kombinasi

Pengukuran pH dilakukan untuk mengetahui kestrabilan larutan ekstrak teh hijau, Vitamin C, serta kombinasi keduanya yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter kertas lakmus sebagai indikator perubahan pH. Sampel larutan ekstrak teh hijau, larutan Vitamin C, dan campuran ekstrak teh hijau–Vitamin C diukur nilai pH-nya pada suhu ruang. Penentuan nilai pH dilakukan dengan mengamati perubahan warna kertas lakmus setelah kontak dengan sampel, kemudian dibandingkan dengan skala warna standar pada kemasan sebelum digunakan dalam pengujian antibakteri.

2.3.7 Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) tunggal dan kombinasi dengan metode checkerboard microdilution assay

Penentuan KHM tunggal dilakukan dengan metode *checkerboard microdilution assay* pada microplate 96-well. Sebanyak 160 µL medium MHB dimasukkan ke dalam setiap sumur *microplate*, lalu ditambahkan dengan 20 µL dari setiap pengenceran konsentrasi tunggal ekstrak teh hijau (8.000 µg/mL hingga 500 µg/mL) dan vitamin C (4.000 µg/mL hingga 500 µg/mL). Kemudian, sebanyak 20 µL suspensi bakteri uji MRSA $1,5 \times 10^6$ CFU/mL ditambahkan ke dalam sumur sehingga total volume menjadi 200 µL. Untuk penentuan KHM kombinasi, prosedur dilakukan dengan memasukkan 160 µL medium MHB, 10 µL ekstrak teh hijau, 10 µL vitamin C, dan 20 µL suspensi bakteri uji MRSA $1,5 \times 10^6$ CFU/mL. Ekstrak teh hijau yang digunakan memiliki variasi konsentrasi 16.000 µg/mL hingga 1.000 µg/mL, sementara vitamin C memiliki variasi konsentrasi 8.000 µg/mL hingga 1.000 µg/mL.

2.3.8 Penentuan diameter zona hambat dengan metode difusi agar

Uji konfirmasi kualitatif untuk efek modulasi dilakukan menggunakan metode difusi cakram agar dengan tiga kali replikasi, diawali dengan menginokulasikan suspensi bakteri MRSA $1,5 \times 10^6$ CFU/mL secara merata menggunakan metode sebar pada permukaan media Mueller-Hinton Agar (MHA). Pada setiap cawan petri, diletakkan enam buah kertas cakram steril yang masing-masing diimpregnasi dengan 20 µL sampel uji, yang terdiri dari cakram A sebagai kontrol tunggal berisi ekstrak teh hijau 800 µg/disk, cakram B, C, dan D sebagai cakram kombinasi yang masing-masing berisi campuran ekstrak teh hijau 800 µg/disk dengan vitamin C pada dosis 400 µg/disk, 200 µg/disk, serta 100 µg/disk, cakram E sebagai kontrol negatif berupa pelarut DMSO 10%, dan cakram F sebagai kontrol positif

berupa antibiotik cefoxitin. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, di mana efek modulasi yang bersifat sinergis terkonfirmasi secara visual apabila terdapat peningkatan diameter zona hambat yang signifikan pada cakram kombinasi dibandingkan dengan cakram kontrol tunggal ekstrak teh hijau, sementara pada cakram kontrol negatif tidak menunjukkan adanya pembentukan zona hambat.

2.3.9 Penentuan nilai faktor modulasi (FM) kombinasi ekstrak teh hijau dengan vitamin C

Faktor modulasi digunakan untuk menggambarkan adanya penurunan nilai KHM suatu agen antibakteri ketika dikombinasikan dengan senyawa modulator. Pengaruh Vitamin C terhadap aktivitas ekstrak teh hijau dievaluasi melalui penentuan nilai Faktor Modulasi (FM) yang diperoleh dari perbandingan antara KHM tunggal dengan KHM kombinasi. Efek modulasi atau jenis interaksi in vitro antara kedua agen tersebut ditentukan berdasarkan nilai akhir FM yang diperoleh

$$FM = \left(\frac{\text{KHM Antibiotik}}{\text{KHM Kombinasi}} \right)$$

2.3.10 Analisis data, pembahasan, dan kesimpulan

Analisis data dilakukan secara kuantitatif dengan menghitung nilai Faktor Modulasi (FM). Analisis kemudian didukung secara kuantitatif dengan mengobservasi hasil metode difusi cakram agar. Hasil gabungan dari perhitungan FM dan observasi visual zona hambat ini digunakan untuk membahas serta menyimpulkan jenis interaksi (modulasi) antara ekstrak teh hijau dan vitamin C.