

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat mengakibatkan resistensi antibiotik yang saat ini menjadi salah satu ancaman kesehatan global. Berdasarkan laporan *Global Antimicrobial Resistance and Use and Surveillance System* (GLASS) oleh *World Health Organization* (WHO) tahun 2022, berbagai bakteri, termasuk *Staphylococcus aureus*, telah menunjukkan resistensi terhadap antibiotik (Osok *et al.*, 2025). Menurut laporan Osok *et al.* (2025), pada tahun 2019, lebih dari 100.000 kematian di seluruh dunia terjadi akibat resistensi antibiotik disebabkan oleh strain *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Di Asia, prevalensi kasus MRSA mencapai 70% dan termasuk yang tertinggi di dunia. Sementara itu, di Indonesia, berdasarkan data *Surveillance of Indonesian Network for Antimicrobial Resistance* (SINAR), prevalensi MRSA di seluruh rumah sakit pada tahun 2023 tercatat sebesar 33% (Osok *et al.*, 2025).

Salah satu faktor yang menyebabkan tingginya resistensi dan kasus infeksi MRSA adalah kemampuannya membentuk biofilm. Bakteri MRSA dapat mempertahankan diri dengan membentuk lapisan pelindung yang disebut biofilm. Biofilm merupakan hasil interaksi *quorum sensing* (QS) antar organisme sehingga membentuk suatu lapisan akibat penempelan bakteri pada permukaan yang sesuai. Keberadaan biofilm tersebut menghambat antibiotik mencapai target kerja pada sel bakteri, sehingga infeksi yang disebabkan oleh MRSA menjadi sulit diobati (Aboelnaga *et al.*, 2024).

Teh hijau (*Camellia sinensis* L.) diketahui mengandung senyawa aktif katekin, flavonoid, dan tanin yang termasuk golongan senyawa fenol dan alkaloid (Pratiwi *et al.*, 2024). Aktivitas antibiofilm teh hijau terutama disebabkan oleh kandungan katekin, khususnya epigallocatekin-3-galat (EGCG), yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Sartini, *et al.* (2019) menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi 0,3 mg/mL terhadap strain MRSA. Namun, penelitian tersebut memiliki keterbatasan, yaitu EGCG dalam teh hijau diketahui memiliki kestabilan yang rendah selama penyimpanan karena mudah mengalami oksidasi (Sartini *et al.*, 2018).

EGCG memiliki stabilitas penyimpanan yang baik dalam lingkungan yang bersifat asam (pH <4), bahkan sangat stabil pada rentang pH 2,2-3 (Xu *et al.*, 2019). Sebaliknya, senyawa ini sangat rentan mengalami oksidasi saat berada pada kondisi pH netral hingga basa (Hua *et al.*, 2020). Untuk mencegah hal tersebut, diperlukan penambahan antioksidan yang mampu menghambat proses oksidasi. Vitamin C merupakan salah satu antioksidan yang mampu melindungi EGCG dari kerusakan karena keduanya berada pada fase air yang sama, sehingga interaksi keduanya dapat meningkatkan kestabilan EGCG dan mencegah oksidasi (Widyaningrum *et al.*, 2015). Dengan demikian, vitamin C dapat berfungsi sebagai modulator yang membantu menjaga kestabilan EGCG dalam teh hijau.

Oleh karena itu, penelitian ini berfokus pada pengujian efek kombinasi vitamin C dan ekstrak teh hijau untuk mengevaluasi kemampuan vitamin C dalam memodulasi aktivitas antibiofilm ekstrak teh hijau terhadap bakteri MRSA.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah apakah vitamin C dapat memodulasi aktivitas antibiofilm dari ekstrak teh hijau terhadap MRSA?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efek modulasi vitamin C terhadap aktivitas antibiofilm ekstrak teh hijau terhadap MRSA.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian adalah autoklaf (*All American Model 25x-2*®), *biological safety cabinet* (BSC) (*Thermo Scientific™ 1300 Series A2*), inkubator (*Memmert*®), kompor elektrik (*Memmert*®), McFarland Densitometer (*Biosan*®), *microplate 96 well* (*ServiceBio*®), mikropipet (*DragonLab*®), oven (*Memmert UN55*®), seperangkat alat gelas (*Pyrex*®), timbangan analitik (*Sartorius*®), *vortex mixer* (*Gemmy*®).

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah *aquadest*, bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, dimetil sulfoksida (DMSO) (*Merck*®), ekstrak kering teh hijau (koleksi Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt.), glukosa (*Merck*®), NaCl 0,9% (*Otsuka*®), medium *Mueller-Hinton Broth* (MHB) (*Himedia*®), medium *Tryptic Soy Agar* (TSA) (*Merck*®), medium *Tryptic Soy Broth* (TSB) (*Himedia*®), pewarna kristal violet (*Merck*®), vitamin C (*Asian*®).

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Pembuatan medium

2.2.1.1 Medium *Mueller-Hinton Broth* (MHB)

Medium MHB sebanyak 2,1 g dilarutkan menggunakan 100 mL air steril. Selanjutnya, medium disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.1.2 Medium *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Medium TSA sebanyak 1,2 g dilarutkan menggunakan 30 mL air steril dengan bantuan pemanasan. Selanjutnya, medium disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.1.3 Medium *Tryptic Soy Broth* + glukosa 1% (TSBG 1%)

Medium TSB sebanyak 3 g dan glukosa sebanyak 1 g dilarutkan dengan 100 mL air steril. Selanjutnya, medium disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.2 Sterilisasi alat

Alat - alat gelas tanpa skala dan alat berbahan logam disterilkan menggunakan oven dengan suhu 180°C selama 1 jam. Sementara, alat - alat gelas berskala serta alat berbahan plastik dan karet disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.3 Penyiapan bakteri uji

2.2.3.1 Peremajaan bakteri uji

Peremajaan isolat bakteri MRSA dilakukan menggunakan media TSA dengan cara mengambil satu ose bakteri dan digoreskan pada media TSA miring. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam.

2.2.3.2 Pembuatan suspensi bakteri

Suspensi biakan dibuat dengan mensuspensikan bakteri MRSA ke dalam 10 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan setara dengan larutan 0,5 McFarland (densitas biakan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Selanjutnya, suspensi biakan diencerkan dengan mencuplik 0,1 mL suspensi biakan setara 0,5 McFarland ke dalam 9,9 mL medium TSBG 1% (densitas biakan $1,5 \times 10^6$ CFU/mL). Konsentrasi akhir densitas biakan yang diinginkan dalam sumuran yaitu $1,5 \times 10^5$ CFU/mL.

2.2.4 Pembuatan larutan uji

2.2.4.1 Ekstrak teh hijau

Larutan uji ekstrak teh hijau dibuat dengan melarutkan ekstrak kering teh hijau sebanyak 40 mg dalam 5 mL pelarut DMSO 2% sehingga diperoleh konsentrasi 8.000 µg/mL. Kemudian, dilanjutkan dengan melakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi 4.000 µg/mL, 2.000 µg/mL, 1.000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, dan 62,5 µg/mL.

Tabel 1. Variasi konsentrasi ekstrak teh hijau

Variasi konsentrasi ekstrak teh hijau yang dibuat (µg/mL)	Konsentrasi akhir ekstrak teh hijau dalam sumuran (µg/mL)
4.000	400
2.000	200
1.000	100
500	50
250	25
125	12,5
62,5	6,25

2.2.4.2 Vitamin C

Larutan uji vitamin C dibuat dengan melarutkan vitamin C sebanyak 20 mg dalam 5 mL pelarut air sehingga diperoleh konsentrasi 4.000 µg/mL. Kemudian, dilanjutkan dengan melakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi 2.000 µg/mL, 1.000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, dan 125 µg/mL.

Tabel 2. Variasi konsentrasi vitamin C

Variasi konsentrasi ekstrak teh hijau yang dibuat ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi akhir ekstrak teh hijau dalam sumuran ($\mu\text{g/mL}$)
2.000	200
1.000	100
500	50
250	25
125	12,5

2.2.5 Uji KHM dengan metode *checkerboard microdilution assay*

Uji penentuan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) ekstrak teh hijau dilakukan menggunakan metode *checkerboard microdilution assay* pada *microplate* 96 well. Medium MHB sebanyak 160 μL ditambahkan ke dalam setiap sumuran, 20 μL larutan uji ekstrak teh hijau dan vitamin C untuk sampel tunggal dan masing-masing 10 μL untuk sampel kombinasi dengan beberapa variasi konsentrasi seperti pada Tabel 1 dan Tabel 2. Kemudian, ditambahkan suspensi biakan MRSA (densitas biakan $1,5 \times 10^6$ CFU/mL) sebanyak 20 μL sehingga total volume menjadi 200 μL . Adapun kontrol yang digunakan tertera pada Tabel 3. Selanjutnya, *microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Selanjutnya, reagen TTC 1% sebanyak 10 μL dimasukkan ke setiap sumuran dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Hasil diamati secara visual berdasarkan perubahan warna menjadi merah dengan konsentrasi terendah tanpa perubahan warna ditetapkan sebagai nilai KHM. (Hasil pengujian KHM diperoleh dari penelitian yang dilakukan oleh Nana Juniarti, 2026).

Tabel 3. Kontrol uji KHM MRSA

Kontrol pengujian	Jumlah cuplikan
ETH tunggal (400 $\mu\text{g/mL}$)	20 μL ETH + 180 μL MHB
VTC tunggal (200 $\mu\text{g/mL}$)	20 μL VTC + 180 μL MHB
Kombinasi ETH dan VTC	10 μL ETH + 10 μL VTC + 180 μL MHB
Bakteri (MRSA)	20 μL suspensi MRSA + 180 μL MHB
Pelarut (DMSO 2%)	20 μL DMSO 2% + 20 μL suspensi MRSA + 180 μL MHB
Media (MHB)	200 μL MHB

Keterangan : ETH = Ekstrak Teh Hijau; VTC = Vitamin C; MHB = *Mueller-Hinton Broth*; MRSA = *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.

2.2.6 Uji penghambatan pembentukan biofilm

Uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm ekstrak teh hijau tunggal dilakukan menggunakan *microplate* 96 well dengan total volume tiap sumuran yaitu 200 μL . Tiap sumuran terdiri atas 160 μL media TSBG 1%, 20 μL ekstrak teh hijau tunggal dengan variasi konsentrasi larutan uji, serta 20 μL suspensi bakteri MRSA densitas $1,5 \times 10^6$ CFU/mL (densitas akhir bakteri uji yang diinginkan dalam sumuran yaitu $1,5 \times 10^5$ CFU/mL). Variasi konsentrasi larutan uji ekstrak teh hijau dapat dilihat pada Tabel 1. Kemudian, *microplate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah inkubasi, isi

microplate dibuang dan dibilas menggunakan air steril. Setiap sumuran kemudian ditambahkan 125 μL larutan kristal violet 0,1% dan didiamkan selama 15 menit. Setelah itu, kristal violet dibuang dan *microplate* kembali dibilas (O'Toole, 2011). Analisis visualisasi yaitu jika terdapat warna ungu yang tidak hilang setelah pencucian, maka dianggap biofilm mikroba terbentuk pada sumuran (Sartini *et al.*, 2019). Selanjutnya *microplate* diisi dengan asam asetat 33%. Biomassa dari lapisan biofilm diukur densitas optik (*optical density* atau OD) menggunakan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 590 nm (O'Toole, 2011). Pengujian penghambatan pembentukan biofilm vitamin C tunggal dilakukan dengan metode yang sama, dengan konsentrasi larutan uji vitamin C dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm pada kombinasi ekstrak teh hijau dan vitamin C dilakukan menggunakan *microplate* 96 *well* dengan total volume tiap sumuran yaitu 200 μL yang terdiri atas 160 μL media TSBG 1%, 10 μL masing-masing konsentrasi larutan uji ekstrak teh hijau dan 10 μL masing-masing konsentrasi larutan uji vitamin C, serta 20 μL suspensi bakteri MRSA (densitas akhir bakteri uji dalam sumuran $1,5 \times 10^5$ CFU/mL). Kemudian, *microplate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan biofilm dilakukan dengan metode yang sama dengan pengamatan biofilm pada ekstrak teh hijau tunggal. Adapun kontrol yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Kontrol uji penghambatan biofilm MRSA

Kontrol pengujian	Jumlah cuplikan
ETH tunggal (400 $\mu\text{g/mL}$)	20 μL ETH + 180 μL TSBG 1%
VTC tunggal (200 $\mu\text{g/mL}$)	20 μL VTC + 180 μL TSBG 1%
Kombinasi ETH dan VTC	10 μL ETH + 10 μL VTC + 180 μL TSBG 1%
Bakteri (MRSA)	20 μL MRSA + 180 μL TSBG 1%
Pelarut (DMSO 2%)	20 μL DMSO 2% + 20 μL suspensi MRSA + 160 TSBG 1%
Media (TSBG 1%)	200 μL TSBG 1%

Keterangan : ETH = Ekstrak Teh Hijau; VTC = Vitamin C; MHB = *Mueller-Hinton Broth*; MRSA = *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.

2.2.7 Penentuan nilai persentase penghambatan biofilm

Persentase penghambatan biofilm dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ hambatan biofilm} = \frac{\text{OD kontrol negatif} - \text{OD sampel}}{\text{OD kontrol negatif}} \times 100\% \text{ (Deviyanti et al., 2025)}$$

2.2.8 Analisis data

Uji aktivitas antibiofilm dilakukan secara kualitatif melalui pengamatan visual pada *microplate* 96 *well* untuk mengidentifikasi pembentukan biofilm, dan secara kuantitatif melalui pengukuran *optical density* (OD) dengan alat *microplate reader* untuk menentukan persentase penghambatan biofilm. Data yang diperoleh ditabulasi menggunakan Microsoft Excel dan dianalisis dengan GraphPad Prism untuk mengevaluasi serta menyimpulkan efek modulasi dari kombinasi ekstrak teh hijau dan vitamin C terhadap pertumbuhan MRSA.