

## Efektivitas Kombinasi Vankomisin dan Vitamin C terhadap Pertumbuhan MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*)

### (Effectiveness of Vancomycin and Vitamin C Combination on MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) Growth)

Ulin Nuha Jazmin<sup>1</sup>, Dini Agustina<sup>2</sup>, Rony Prasetyo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember

<sup>2</sup>Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

<sup>3</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jl. Kalimantan no. 37 Tegalboto, Jember

e-mail: dini\_agustina@unej.ac.id

#### Abstract

*Nephrotoxicity due to prolonged use of vancomycin becomes a big issue in patients with MRSA infections and the use of vitamin C has been proved to decrease this side effect. Vitamin C with its combination with antibiotic will halt MRSA growth by forming Reactive Oxygen Species (ROS). This study aimed to determine the effect of vancomycin and vitamin C combination in order to halt the MRSA growth and the minimum concentration of vitamin C which can decrease the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of vancomycin. This study used a quasi experimental design with 7 groups, 1 as negative control which only given vancomycin and 6 other groups which given vancomycin and vitamin C with following concentration 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; and 12,8 mg/mL. We used microdilution method with 4 repetitions to measure the MIC value. This study revealed that there were no difference between control and other groups, the MIC of vancomycin is 1 µg/mL. Combination effect was measured by Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) calculation which showed indifferent effect to all groups. This study concluded that combination of vancomycin and vitamin C effect has no difference with control group and by adding vitamin C until 12,8 mg/mL did not decrease MRSA growth.*

**Keywords:** MRSA, vancomycin, vitamin C, Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

#### Abstrak

Nefrotoksisitas akibat penggunaan jangka panjang vankomisin menjadi masalah serius pada pasien infeksi MRSA dan penggunaan vitamin C telah terbukti mengurangi efek samping ini. Vitamin C dalam kombinasinya dengan antibiotik dapat meningkatkan hambatan pertumbuhan MRSA melalui mekanisme pembentukan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kombinasi vankomisin dan vitamin C terhadap pertumbuhan MRSA dan untuk mengetahui konsentrasi minimum vitamin C yang dapat menurunkan Kadar Hambat Minimum (KHM) vankomisin. Jenis penelitian adalah *quasi experimental design* dengan 7 kelompok, berupa 1 kelompok kontrol negatif yang diberikan vankomisin dan 6 kelompok perlakuan yang diberikan vankomisin dan vitamin C dengan konsentrasi 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; dan 12,8 mg/mL. Pengukuran KHM menggunakan metode mikrodilusi dengan 4 kali pengulangan. Nilai KHM vankomisin pada kelompok perlakuan tidak mengalami penurunan dibandingkan kelompok kontrol yaitu 1 µg/mL. Efek kombinasi didapatkan dengan perhitungan Kadar Hambat Fraksional Indeks (KHFI) yang menunjukkan efek *indifferent* pada semua kelompok perlakuan. Kesimpulan penelitian ini adalah tidak ada efek pada kombinasi vankomisin dan vitamin C yang dibandingkan dengan kelompok kontrol dan penambahan vitamin C hingga konsentrasi 12,8 mg/mL tidak menurunkan KHM vankomisin.

**Kata kunci:** MRSA, vankomisin, vitamin C, Kadar Hambat Minimum (KHM)

## Pendahuluan

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif yang dapat menyebabkan infeksi lokal maupun sistemik. Untuk mengeradikasi infeksi yang disebabkan oleh bakteri termasuk *S. aureus*, peran antibiotik yang sesuai sangatlah penting. Antibiotik yang paling sering digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah golongan beta laktam seperti penisilin. Akan tetapi hampir 90% strain *S. aureus* yang ditemukan di rumah sakit telah mengalami resistensi terhadap golongan penisilin, khususnya metisilin. Strain dari *S. aureus* tersebut dikenal dengan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) [1].

Angka insidensi MRSA di negara maju lebih dari 50% sedangkan di negara berkembang angka insidensi sekitar 25-50% [2]. Sebagai contoh di Indonesia sebagai negara berkembang, pada tahun 2011 insidensinya mencapai 28% dari seluruh kasus infeksi *S. aureus* [3]. Pada tahun 2003, di RS Atmajaya Jakarta insidensi MRSA mencapai 47% dan di RSUP Dr. Moh. Hoesin Palembang mencapai 46% [4]. Pada penelitian yang lain pada tahun 2001-2002 di RS Kariyadi Semarang, MRSA tidak ditemukan pada pasien rawat inap. Akan tetapi pada tahun 2014 penelitian tersebut dilakukan kembali dan terdapat 47 pasien yang positif mengalami infeksi MRSA dari 786 pasien yang mengalami infeksi *S. aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat peningkatan angka insidensi MRSA di Indonesia [5]. Oleh karena itu pengobatan terhadap MRSA perlu menjadi perhatian khusus.

Dewasa ini antibiotik lini pertama yang digunakan untuk infeksi MRSA adalah vankomisin [6]. Di Indonesia vankomisin digunakan sebagai *life saving* untuk infeksi MRSA [7]. Penggunaan vankomisin yang meningkat akibat peningkatan angka insidensi infeksi MRSA memungkinkan terjadinya penurunan kerentanan dan resistensi dari vankomisin sehingga terjadi penurunan sensitifitas bakteri terhadap antibiotik tersebut. Menurut data internasional dari *Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial* (T.E.S.T) penurunan kerentanan vankomisin terhadap MRSA mengalami peningkatan dari 5,6% pada tahun 2004 menjadi 11,1% pada tahun 2009 [8].

Untuk mengurangi penurunan kerentanan dan resistensi suatu antibiotik yang semakin meningkat, diperlukan adanya agen lain seperti vitamin C yang dapat meningkatkan efektivitas antibiotik dalam menghambat

pertumbuhan bakteri. Kombinasi vitamin C dapat meningkatkan kerja antibiotik dalam mengeradikasi bakteri disebabkan karena vitamin C berperan sebagai prooksidan yang dapat memicu terbentuknya *Reactive Oxygen Species (ROS)* pada bakteri yang nantinya akan memengaruhi pertumbuhan dari bakteri tersebut [9]. Mekanisme antibiotik dalam mengeradikasi bakteri juga menghasilkan ROS, sehingga kombinasi dengan vitamin C akan meningkatkan hambatan pertumbuhan bakteri [10]. Selain itu, vitamin C juga dapat menghambat pembentukan biofilm sehingga meningkatkan kerja antibiotik karena tidak terdapat barier yang menghalangi aktivitas antibiotik [5]. Pada penelitian sebelumnya, penggunaan vitamin C dapat mencegah terjadinya nefrotoksitas dari vankomisin pada manusia. Hal ini dibuktikan dengan menurunnya kejadian *acute kidney injury* sebesar 63% pada pasien yang mendapatkan terapi vankomisin di Hendrick Medical Center, Texas [11]. Kombinasi vankomisin dan vitamin C diharapkan dapat mengurangi kejadian penurunan kerentanan dan resistensi vankomisin terhadap MRSA, serta diharapkan dapat mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh vankomisin seperti nefrotoksitas.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kombinasi vankomisin dan vitamin C dalam menghambat pertumbuhan MRSA dan untuk mengetahui konsentrasi minimum vitamin C yang dapat menurunkan KHM vankomisin secara *in vitro*.

## Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada bulan Oktober-November 2016.

Jenis penelitian ini adalah *quasi experimental design*. Uji sensitivitas kombinasi vankomisin dan vitamin C terhadap pertumbuhan MRSA menggunakan metode mikrodilusi. Terdapat 7 kelompok dengan 1 kelompok kontrol negatif yang hanya berisi vankomisin dengan konsentrasi bertingkat dua kali lipat mulai dari 0,03-16 µg/mL dan 6 kelompok perlakuan (P1-6) berisi vankomisin dengan konsentrasi bertingkat dua kali lipat mulai dari 0,03-16 µg/mL dan masing-masing kelompok (P1-6) diberikan vitamin C dengan konsentrasi 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; dan 12,8 mg/mL. Penelitian ini dilakukan 4 kali pengulangan yang didapatkan dari perhitungan

rumus Federer. Sampel yang digunakan adalah bakteri MRSA ATCC® BAA-1026™\*.

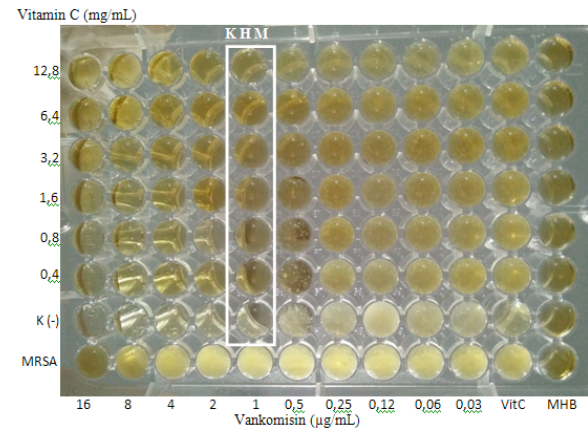
Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi vitamin C 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; dan 12,8 mg/mL. Variabel terikat adalah nilai KHM vankomisin. Dan variabel kendali pada penelitian ini meliputi pembuatan suspensi bakteri MRSA dan Muller Hinton Broth (MHB), perhitungan konsentrasi obat, waktu inkubasi dan suhu inkubator saat penelitian.

Uji sensitivitas yang digunakan untuk mengetahui KHM dan efek kombinasi vankomisin dan vitamin C pada pertumbuhan MRSA dengan metode mikrodilusi. Konsentrasi vankomisin yang digunakan yaitu 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 dan 0,03 µg/mL dan untuk vitamin C yaitu 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; dan 0,4 mg/mL. Interpretasi efek kombinasi antara vankomisin dan vitamin C dilakukan dengan membandingkan nilai KHM pada kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol. Apabila nilai KHM pada kelompok perlakuan lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol, hal ini mempunyai arti bahwa vitamin C dapat meningkatkan kerja antibiotik vankomisin. Begitupula sebaliknya, apabila nilai KHM pada kelompok perlakuan lebih besar dari kelompok kontrol, mempunyai arti bahwa vitamin C menghambat kerja antibiotik vankomisin. Setelah diketahui nilai KHM masing-masing kemudian dilakukan pencarian Kadar Hambat Fraksional (KHF) dan Kadar Hambat Fraksional Indeks (KHFI) yang bertujuan untuk mengetahui efek yang terjadi pada kombinasi kedua obat tersebut apakah terjadi aktivitas sinergis, *additive*, *indifferent*, maupun antagonis.

## Hasil Penelitian

Efektivitas kombinasi vankomisin dan vitamin C terhadap pertumbuhan MRSA dapat diamati setelah melakukan penelitian berupa uji sensitivitas obat kombinasi dengan metode mikrodilusi. Efek yang diamati adalah kejernihan dan tidak timbulnya endapan dari masing-masing *well* yang menandakan pertumbuhan MRSA terhambat sehingga dapat ditentukan nilai KHM dari masing-masing kelompok. Pengamatan hasil penelitian ini dilakukan dengan menggunakan mata tanpa bantuan alat dan diamati oleh tiga orang yaitu peneliti, dosen pembimbing, dan rekan mahasiswa untuk menghindari subjektivitas dari peneliti. Selain melakukan uji sensitivitas obat kombinasi, peneliti juga melakukan uji sensitivitas vitamin C tunggal terhadap pertumbuhan MRSA. Dari uji

sensitivitas ini didapatkan hasil bahwa vitamin C tunggal dengan dosis 0,006 mg/mL hingga 40 mg/mL tidak dapat menghambat pertumbuhan MRSA.



Gambar 1. Hasil Kombinasi Vankomisin dan Vitamin C

Hasil pengamatan nilai KHM pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan (Gambar 1) menunjukkan bahwa nilai KHM kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan vankomisin adalah 1 µg/mL dan pada kelompok perlakuan P1-6 yang ditambahkan vankomisin dan vitamin C dengan berbagai konsentrasi, nilai KHM vankomisin adalah 1 µg/mL. Setelah diketahui nilai KHM tunggal dan kombinasi dari vankomisin dan vitamin C, kemudian dapat dilakukan pencarian Kadar Hambat Fraksional (KHF) dan Kadar Hambat Fraksional Indeks (KHFI) yang bertujuan untuk mengetahui efek yang terjadi pada kombinasi kedua obat tersebut apakah terjadi aktivitas sinergis, *additive*, *indifferent*, maupun antagonis. Nilai KHF didapatkan dari perbandingan KHM kombinasi dengan KHM tunggal dari masing-masing agen antibakteri, sedangkan KHFI adalah penjumlahan dari KHF masing-masing agen antibakteri. Nilai KHFI dikatakan sinergis apabila  $\leq 0,5$ , *additive* apabila nilai KHFI  $> 0,5$  dan  $\leq 1$ , *indifferent* apabila nilai KHFI  $> 1$  dan  $\leq 2$ , dan antagonis apabila nilai KHFI  $> 2$  [12]. Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa KHFI dari kombinasi vankomisin dan vitamin C dengan berbagai konsentrasi memiliki efek sama yaitu *indifferent*.

$$\text{KHFI} = \text{KHF}_A + \text{KHF}_B$$

$$= (\text{KHM}_{\text{kombinasiA}}/\text{KHM}_A) + (\text{KHM}_{\text{kombinasiB}}/\text{KHM}_B)$$

Tabel1. Interaksi Vitamin C terhadap Vankomisin dalam Menghambat Pertumbuhan MRSA

Kel	Agen	KHM tunggal	KHM kombinasi	KHF	KHFI	Efek
P1	VA VC	1 40	1 0,4	1 0,01	1.01	<i>Indifferent</i>
P2	VA VC	1 40	1 0,8	1 0,02	1.02	<i>Indifferent</i>
P3	VA VC	1 40	1 1,6	1 0,04	1.04	<i>Indifferent</i>
P4	VA VC	1 40	1 3,2	1 0,08	1.08	<i>Indifferent</i>
P5	VA VC	1 40	1 6,4	1 0,16	1.16	<i>Indifferent</i>
P6	VA VC	1 40	1 12,8	1 0,32	1.32	<i>Indifferent</i>

KHM : kadar hambat minimum  
 KHF : kadar hambat fraksional  
 KHFI : kadar hambat fraksional indeks  
 VA : vankomisin  
 VC : vitamin C

## Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan uji sensitivitas kombinasi antara vankomisin dengan vitamin C terhadap pertumbuhan bakteri MRSA. Dari penelitian didapatkan hasil pada kontrol negatif bahwa isolat bakteri MRSA ATCC® BAA-1026™\* masih sensitif terhadap antibiotik vankomisin yang ditunjukkan dengan hasil nilai KHM 1 µg/mL, dimana vankomisin dikatakan sensitif terhadap MRSA apabila nilai  $KHM \leq 2 \mu\text{g/mL}$  [13]. Hal ini membuktikan bahwa antibiotik vankomisin masih dapat digunakan sebagai *drug of choice* untuk bakteri MRSA.

Berdasarkan Gambar 1, pada kelompok kontrol negatif terdapat hambatan pertumbuhan sehingga dapat menentukan nilai KHM vankomisin yaitu 1 µg/mL. Pada kelompok perlakuan P1-6 yang ditambahkan vankomisin dan vitamin C dengan konsentrasi 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; dan 12,8 mg/mL, nilai KHM vankomisin tidak mengalami perubahan dan memiliki nilai KHM yang sama dengan kontrol negatif yaitu 1 µg/mL. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kombinasi vankomisin dan vitamin C pada konsentrasi tersebut tidak menurunkan maupun meningkatkan nilai KHM dari vankomisin. Setelah diketahui nilai KHM vankomisin, vitamin C, dan kombinasi keduanya, kemudian dapat dilakukan pencarian nilai KHF dan KHFI dari masing-masing kelompok perlakuan.

Berdasarkan Tabel 1, didapatkan hasil bahwa pada keenam kelompok perlakuan memiliki efek *indifferent* dan tidak didapatkan efek sinergis maupun antagonis. Ketika kedua agen antibakteri bertindak secara bersamaan pada suatu populasi bakteri, salah satu efek yang dapat terjadi adalah *indifferent*, dimana aksi kombinasi yang terjadi tidak lebih baik daripada efektivitas yang dihasilkan ketika antibakteri tersebut digunakan secara tunggal [14]. Hasil KHFI *indifferent* juga dapat diartikan pada kombinasi obat tersebut terdapat obat yang inaktif yang tidak menambahkan efek pada kombinasi dan hanya obat yang aktiflah yang memberikan efek [15].

Peran vitamin C dalam kombinasinya dengan antibiotik sangat berkaitan dengan terbentuknya  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Akan tetapi sifat prooksidan vitamin C sangat dipengaruhi dengan kondisi lingkungan seperti suhu, pH, adanya  $\text{O}_2$  dan iron (Fe). Pada penelitian sebelumnya peran prooksidan vitamin C secara optimal dapat terjadi dalam keadaan aerob dan lingkungan asam (pH 6), hal ini dibuktikan ketika vitamin C ditambahkan kedalam sel bakteri anaerob yang terpapar  $\text{O}_2$  dan dengan pH 6 dapat meningkatkan stres oksidatif yang mengakibatkan peningkatan kerusakan DNA bakteri, akan tetapi ketika tidak terpapar  $\text{O}_2$  penambahan vitamin C tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri dan ketika vitamin C ditambahkan pada bakteri dengan pH 5, vitamin C menyebabkan kematian sel bakteri berkurang meskipun terdapat  $\text{O}_2$  [16]. Pada penelitian ini, pH dari bahan yang digunakan diukur terlebih dahulu menggunakan pH universal. Dari hasil pengukuran didapatkan, media MHB memiliki pH 6, *stock solution* vankomisin memiliki pH 7-8, dan *stock solution* vitamin C memiliki pH 6-7. PH lingkungan pada penelitian ini dimungkinkan berkisar antara 6-8. Pada penelitian ini, kombinasi vankomisin dengan vitamin C hingga konsentrasi 12,8 mg/mL tidak mengalami perubahan pada aktivitas antibakteri vankomisin, kemungkinan karena vitamin C dengan dosis tersebut dan dalam penelitian ini pH lingkungan berkisar 6-8 belum optimal dalam menghasilkan konsentrasi  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang dibutuhkan untuk membantu vankomisin dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA dan penelitian mengenai jumlah konsentrasi  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang dapat dihasilkan oleh vitamin C belum pernah dilakukan. Mekanisme kerja vitamin C dalam mempengaruhi kerja

antibiotik yang menghasilkan bermacam-macam efek pada pertumbuhan bakteri belum diketahui secara pasti hingga saat ini.

Vitamin C dapat berperan sebagai prooksidan maupun antioksidan tergantung lingkungan disekitarnya. Vankomisin sebagai *drug of choice* untuk infeksi MRSA dalam aksinya juga dapat menghasilkan ROS berupa hidroksil radikal. Akan tetapi ROS yang dihasilkan oleh antibakteri yang bersifat bakterisidal tidak ada kaitannya dengan kerja antibiotik tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, belum ada data yang tersedia mengenai efek ROS yang dihasilkan vankomisin dalam membunuh bakteri [17]. Sehingga apabila vitamin C dalam penelitian ini berperan sebagai antioksidan tidak akan memengaruhi kerja vankomisin dalam menghambat pertumbuhan MRSA. Dalam penelitian *in vivo* maupun uji klinis pada manusia, kombinasi vankomisin dengan vitamin C telah terbukti dapat mengurangi dan mencegah terjadinya nefrotoksisitas akibat vankomisin. Vitamin C melindungi kerusakan renal tubular dengan meningkatkan pengeluaran *nitric oxide* dalam urin dan mengurangi terbentuknya ROS yang dapat menyebabkan kerusakan ginjal akut [11].

Selain kemungkinan sifat prooksidan yang tidak berperan secara optimal dan peran antioksidan dari vitamin C yang tidak dapat memengaruhi kerja vankomisin, *Staphylococcus aureus* dalam mempertahankan hidupnya juga menghasilkan suatu enzim yang dapat melindungi bakteri tersebut dari ROS, yaitu enzim katalase. Katalase yang dihasilkan oleh bakteri *S. aureus* akan mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  sehingga dapat mengurangi jumlah ROS yang terbentuk dalam bakteri akibat metabolisme aerob maupun paparan ROS dari lingkungan. Sehingga dengan adanya enzim katalase dimungkinkam dapat melindungi bakteri dari kerusakan DNA akibat paparan ROS yang dihasilkan oleh vankomisin dan vitamin C [18].

Dari penelitian dan pembahasan diatas, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan efek antara kombinasi vankomisin dan vitamin C hingga konsentrasi 12,8 mg/mL dengan pemberian vankomisin tunggal dalam menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*.

## Simpulan dan Saran

Tidak ada perbedaan efek antara kombinasi vankomisin dan vitamin C dengan pemberian vankomisin tunggal terhadap pertumbuhan MRSA secara *in vitro*. Vitamin C hingga dosis 12,8 mg/mL tidak menurunkan nilai KHM vankomisin dalam menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*.

Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan dosis vitamin C yang lebih besar.

## Daftar Pustaka

- [1] Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzer TA. Jawets, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology. Twenty-fifth Edition. United States of America: The McGraw-Hill Medical; 2010.
- [2] Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012; 39: 273-282.
- [3] Chin CJ, Huang YC. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. *Clinical Microbiology and Infection Oxford Journal*. 2014; 20(7): 605-623.
- [4] Yuwono. Mekanisme Molekuler Resistensi Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Palembang: Departemen Mikrobiologi FK Universitas Sriwijaya; 2010.
- [5] Santosaningsih D, Santosa S, Budayanti NS, Kuntaman K, Lestari ES, Farida H, et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* harboring the *mecA* or *panton-valentine leukocidin* genes in hospitals in Java and Bali, Indonesia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014; 90(4): 728-734.
- [6] Guiliano C, Haase KK, Hall R. Use of *vancomycin pharmacokinetic-pharmacodynamic* properties in the treatment of MRSA infections. *Expert Reviews Anti Infection Therapy*. 2010; 8(1): 95-106.
- [7] Indonesia. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 312 Tahun 2013. Daftar Obat Esensial Nasional 2013. Kementerian Kesehatan; 2013.
- [8] Gould IM, David MZ, Esposito S, Gurau J, Lina G, Mazzei T, et al. New insight into Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment, and

- resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012; 39: 96-104.
- [9] Levine M, Padayatty SJ, Espey MG. Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *American Society for Nutrition Adv*. 2011; 2: 78-88.
- [10] Zhao X, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Current Opinion in Microbiology*. 2014; 21: 1-6.
- [11] Akundi S, Lee YR, Perry GK, Fike DS, Mnjoyan S. Nephrotoxicity in recipients of vancomycin vs. vancomycin with vitamin C. *International Journal of Medicine and Pharmacy*. 2015; 3(2): 1-15.
- [12] Khameneh B, Bazzaz BSF, Amani A, Rostami J, Vahdati-Mashhadian N. Combination of anti-tuberculosis drugs with vitamin C or NAC against different *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Microbial Pathogenesis*. 2016; 93: 83-87.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Twenty-fourth Informational Supplement. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standar Institute Consensus Process; 2014.
- [14] Satria AD. Daya antibakteri kombinasi chitosan-gentamisin terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada; 2013.
- [15] Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additives interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combination against *Aspergillus Furmigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54 (2): 602-609.
- [16] Shi M, Xu B, Azakami K, Morikawa T, Watanabe K, Morimoto K, et al. Dual role of vitamin C in an oxygen-sensitive system: discrepancy between DNA damage and cell death. *Free Radical Research*. 2005; 39 (2): 213-220.
- [17] Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulyacahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on Reactive Oxygen Species. *Science*. 2013; 339 (6124) : 1213-1216.
- [18] Levinson W. Review of Medical Microbiology and Immunology, Twelfth Edition. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012.