

Efek Penambahan Vitamin C terhadap Aktivitas Klindamisin dalam Menghambat Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* secara *In Vitro*

(The Addition Effect of Vitamin C towards Clindamycin Inhibition Activity Against the Growth *Streptococcus pneumoniae* In Vitro)

Bagus Dwi Kurniawan, Dini Agustina, Erfan Efendi
Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121
e-mail: dini.agustina83.fk@unej.ac.id

Abstract

Pneumonia is one of the lower respiratory tract infection involving respiratory bronchioles and alveoli that mostly caused by Streptococcus pneumoniae. Clindamycin is one of the drug of choice for pneumoniae. This drugs inhibits the growth of S. pneumoniae by producing ROS (Reactive Oxygen Species). Recent study has shown that vitamin C could generate ROS leading to DNA-damage on bacteria. The aims of this study was to know the possible benefit effect of adding vitamin C towards clindamycin inhibition activity against the growth of S. pneumoniae in vitro. This research was conducted by using 7 groups which consist of negative control (aquades), positive control (clindamycin), and test group 1 until 5 that given the combination of clindamycin and vitamin C as follows 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; and 40 mg/ml. The inhibition effect of growing S. pneumoniae shown by the inhibition zone diameter. The average of inhibition zone on negative control, positive control, and test group were 5; 24,12; 24,62; 26,08; 27,58; 28,74; and 29,76 mm. These result show a significant correlation based on Pearson test (the coefficient correlation's result is +0,910). The logarithmic regression revealed the minimal concentration of vitamin C was 1,767 mg/ml. It can be concluded that vitamin C increased the activity of clindamycin by inhibiting the growth of S.pneumoniae in vitro.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, ROS, Clindamycin, Vitamin C

Abstrak

Pneumonia merupakan infeksi saluran napas bagian bawah pada bronkiolus respiratorius dan alveoli yang disebabkan karena *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Klindamisin merupakan *drug of choice* pengobatan pneumonia. Klindamisin dapat menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* dengan memproduksi ROS (*Reactive Oxygen Species*). Penelitian terbaru menunjukkan vitamin C dapat memproduksi ROS yang menimbulkan *DNA-damage* pada bakteri. Tujuan penelitian ini ialah mengetahui efek penambahan vitamin C terhadap aktivitas klindamisin dalam menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* secara *in vitro*. Kelompok penelitian terbagi menjadi 7 kelompok yang terdiri atas kontrol negatif (aquades), kontrol positif (klindamisin), dan perlakuan 1 hingga 5 diberikan klindamisin dan konsentrasi vitamin C berturut 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; dan 40 mg/ml. Hambatan pertumbuhan *S. pneumoniae* ditunjukkan dengan diameter zona hambat. Rata-rata diameter zona hambat pada kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan 1 hingga 5 berturut-turut ialah 5; 24,12; 24,62; 26,08; 27,58; 28,74; dan 29,76 mm. Data tersebut memiliki korelasi yang kuat pada uji Pearson (hasil koefisien korelasi +0,910). Pada uji regresi logaritmik didapatkan konsentrasi minimal vitamin C yang dapat menghambat adalah 1,767 mg/ml. Hal ini menunjukkan vitamin C meningkatkan aktivitas klindamisin dalam menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* secara *in vitro*.

Kata kunci: *Streptococcus pneumoniae*, ROS, klindamisin, vitamin C

Pendahuluan

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) merupakan flora normal di hidung dan faring dapat dengan mudah ditransmisikan melalui droplet dari orang ke orang. Transmisi dari *S. pneumoniae* meningkat bersamaan dengan infeksi saluran nafas ketika sekresi mukus, batuk, dan bersin yang meningkat. Bakteri ini menyebabkan berbagai penyakit yang luas seperti meningitis, bakterimia, pneumonia, otitis media, dan berbagai penyakit infeksi lainnya yang tidak jarang seperti endokarditis dan artritis [1]. *S. pneumoniae* merupakan patogen yang paling sering menyebabkan penyakit pneumonia. Berdasarkan data dari WHO dan UNICEF, 50% penyebab pneumonia disebabkan karena bakteri *S. pneumoniae*, 20% disebabkan karena *Haemophilus influenzae* tipe B, dan 30% disebabkan oleh virus [2].

Pneumonia menjadi penyebab terbesar kematian balita di Indonesia sekitar 23% berdasarkan hasil survei Kematian Balita tahun 2005 [3]. Propinsi Jawa Timur merupakan salah satu propinsi dengan tingkat pneumonia yang tinggi. Berdasarkan laporan Kabupaten/Kota di Jawa Timur, Jumlah kasus pneumonia tahun 2009 sebanyak 84.392 kasus atau sekitar 27,08% dari jumlah penderita pneumonia di Indonesia. Jumlah presentase penderita pneumonia balita di setiap kabupaten atau kota di Jawa Timur sangat beragam. Sedangkan di Jember jumlah penderita pneumonia sebesar 16,42% [4].

Dari angka prevalensi kejadian pneumonia yang tinggi, pemberian antibiotik merupakan pilihan terapi yang tepat saat terjadi kasus infeksi oleh bakteri. Pilihan antibiotik yang sesuai untuk mengeradikasi infeksi bakteri *S. pneumoniae* adalah klindamisin yang merupakan turunan dari linkomisin. Klindamisin bekerja dalam menghambat sintesis protein bakteri dan mempunyai efek kerja bakteristatik dan bakterisidal, tergantung dari dosis obatnya. Klindamisin aktif melawan kebanyakan dari organisme gram positif, termasuk *S. pneumoniae*. Obat ini tidak efektif melawan bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli*, *Proteus*, dan *Pseudomonas* [5].

Pada kebanyakan kasus infeksi, pemberian terapi farmakologis tambahan tidak jarang pula diberikan. Salah satu terapi yang dipakai adalah pemberian vitamin C. Vitamin C

diketahui dapat menghambat aktivitas enzim dari *S. pneumoniae* sehingga dapat mengurangi penyebaran bakteri patogen ini di fase awal invasi pneumokokus [6].

Terdapat beberapa penelitian yang menyebutkan bahwa penambahan vitamin C mampu meningkatkan kerja antibiotik dalam mengeradikasi bakteri. Hal ini disebabkan karena vitamin C memiliki sifat prooksidan [7]. Mekanisme antibiotik dalam mengeradikasi bakteri salah satunya adalah dengan membentuk ROS. Sifat prooksidan dalam vitamin C mampu membantu pembentukan ROS sehingga dapat meningkatkan efek bakterisidal. [7]. Oleh karena itu peneliti ingin meneliti tentang efek penambahan vitamin C terhadap aktivitas klindamisin dalam menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* secara *in vitro*.

Metode Penelitian

Penelitian telah disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Kelompok penelitian terdiri atas kontrol negatif (aquades), perlakuan 1 (2 µg klindamisin + vitamin C 2,5 mg/ml), perlakuan 2 (2 µg klindamisin + vitamin C 5 mg/ml), perlakuan 3 (2 µg klindamisin + vitamin C 10 mg/ml), perlakuan 4 (2 µg klindamisin + vitamin C 20 mg/ml), perlakuan 5 (2 µg klindamisin + vitamin C 40 mg/ml), dan kontrol normal (klindamisin 2 µg). Pengulangan dilakukan sebanyak empat kali eksperimen.

S. pneumoniae berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Isolat *S. pneumoniae* diremajakan dengan menggunakan media biakan agar darah diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam. Koloni bakteri ditambahkan aquades ke dalam sebuah tabung reaksi dan didilusi sampai mencapai kekeruhan sesuai 0.5 Mc Farland Standard [8].

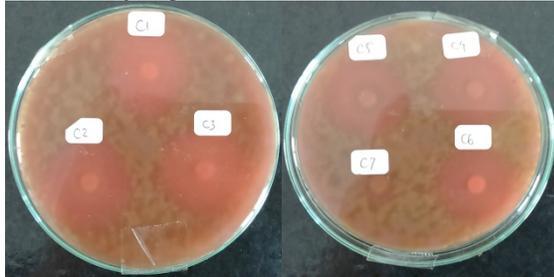
Klindamisin yang digunakan ialah klindamisin generik kapsul 300 mg. Peneliti membuat *stock solution* klindamisin yang dilarutkan ke dalam etanol 96% hingga mencapai konsentrasi 0,4 mg/ml atau setara dengan 2µg/5µl. Vitamin C yang digunakan ialah ipi vitamin C tablet 50 mg. Peneliti membuat *stock solution* vitamin C yang dilarutkan dalam aquades hingga mencapai konsentrasi 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml. *Stock solution* klindamisin dan vitamin C dicampur ke dalam vial dengan volume masing-

masing 1 ml dan diteteskan sebanyak 10 µl ke dalam cakram *whatmann filter paper*. Pada kontrol negatif dan positif hanya diteteskan sebanyak 5 µl pada setiap cakram.

Media uji sensitivitas yang digunakan adalah media mueller hinton agar yang disuplementasi dengan 5% darah domba. Suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasikan ke dalam media *mueller hinton* agar yang disuplementasi 5% darah domba. Setelah itu dilakukan peletakan cakram *whatmann filter paper* yang telah diteteskan aquades, klindamisin, dan campuran klindamisin dengan vitamin C ke dalam media yang sudah diinokulasi suspensi bakteri *S. pneumoniae*. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam [8]. Zona bening pada sekitar cakram menunjukkan terhambatnya pertumbuhan bakteri yang disebut dengan diameter zona hambat. Pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong yang ditunjukkan dengan skala milimeter dianalisis dengan uji korelasi Pearson dan Regresi Logaritmik untuk menentukan hubungan antar variabel dan konsentrasi minimal vitamin C yang dibutuhkan dapat meningkatkan aktivitas antibakteri klindamisin [9].

Hasil Penelitian

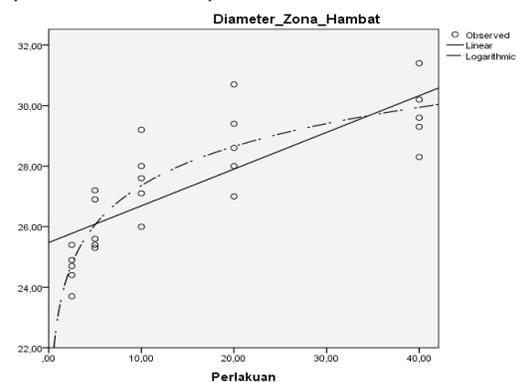
Diameter zona hambat yang ditunjukkan dengan zona bening pada media (Gambar 1) menunjukkan bahwa terhambatnya pertumbuhan bakteri oleh klindamisin dan kombinasi klindamisin dan vitamin C secara *in vitro*. Diameter zona hambat tersebut cenderung mengalami peningkatan seiring peningkatan konsentrasi vitamin C yang ditambahkan dalam klindamisin.



Gambar 1. Diameter zona hambat menunjukkan peningkatan seiring peningkatan konsentrasi vitamin C yg ditambahkan. Keterangan : C1 (klindamisin), C2; C3; C4; C5; C6 (klindamisin + vitamin C 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; 40 mg/ml), dan C7 (aquades)

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat didapatkan rata-rata peningkatan dari kontrol positif yang tidak diberikan vitamin C sampai kelompok perlakuan yang ditambahkan vitamin C 40 mg/ml. Rata-rata pada kontrol positif didapatkan 24,12. Sedangkan rata-rata pada kelompok perlakuan yang ditambahkan konsentrasi vitamin C 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, dan 40 mg/ml berturut-turut ialah 24,62; 26,08; 27,58; 28,74; dan 29,76 mm.

Data yang telah diperoleh dilakukan uji analisis statistik meliputi uji normalitas data, uji homogenitas data, uji korelasi Pearson, dan uji regresi logaritmik untuk menentukan hubungan antarvariabel dan konsentrasi minimal vitamin C yang ditambahkan dapat meningkatkan aktivitas klindamisin. Uji normalitas data menunjukkan signifikansi lebih dari 0,05 menunjukkan data terdistribusi normal. Uji homogenitas data menunjukkan signifikansi lebih dari 0,05 menunjukkan data homogen atau memiliki variansi sama. Uji pearson dilakukan apabila data terdistribusi normal dan memiliki variansi sama, didapatkan hasil korelasi Pearson +0,910 menunjukkan keeratan hubungan searah antarvariabel. Uji regresi logaritmik dilakukan karena data yang diperoleh menunjukkan kurva hiperbola (Gambar 2). Uji regresi logaritmik didapatkan koefisien A dan B berturut-turut adalah 23,057 dan 1,867. Koefisien tersebut dimasukkan ke dalam rumus regresi logaritmik $y=A+B \ln x$ didapatkan hasil x yaitu 1,767 mg/ml merupakan konsentrasi minimal vitamin C dapat meningkatkan aktivitas klindamisin terhadap pertumbuhan *S. pneumoniae*.



Gambar 2. Kurva konsentrasi vitamin C terhadap diameter zona hambat melalui uji regresi linear dan logaritmik

Pembahasan

Pneumonia merupakan penyakit infeksi saluran nafas bawah yang masih cukup tinggi angka kejadiannya dengan etiologi yang paling sering yaitu *S. pneumoniae*. Pemberian antibiotik merupakan penatalaksanaan yang tepat ketika terjadi kasus infeksi bakteri. Antibiotik yang direkomendasikan untuk penatalaksanaan pneumonia oleh *American Thoracic Society* salah satunya adalah antibiotik golongan *lincosamide* yaitu klindamisin [10]. Sedangkan untuk pengobatan tambahan selain antibiotik tidak jarang diberikan yaitu vitamin C untuk meningkatkan daya tahan tubuh. Vitamin C diduga mampu membantu kerja antibiotik dalam mengeradikasi bakteri penyebab infeksi saluran nafas, hal ini karena sifat vitamin C yang berperan sebagai prooksidan dan menghambat *hyaluronate lyase* bakteri [6].

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa vitamin C mampu meningkatkan aktivitas klindamisin dalam menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae*. Diameter zona hambat mengalami peningkatan seiring penambahan konsentrasi vitamin C dalam klindamisin. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C memiliki kemampuan dalam menghambat *Streptococcus pneumoniae* melalui produksi ROS meskipun pada penelitian hanya dilihat melalui peningkatan diameter zona hambat. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi vitamin C mulai mampu meningkatkan aktivitas klindamisin dalam menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* ialah 2,5 mg/ml.

Peningkatan diameter zona hambat pada kelompok perlakuan menandakan bahwa vitamin C meningkatkan aktivitas antibakteri klindamisin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. pneumoniae*. Peningkatan aktivitas antibakteri klindamisin tersebut terjadi karena mekanisme vitamin C sebagai agen prooksidan yang ditandai dengan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri dari kelompok radikal dan nonradikal. Vitamin C dapat berikatan dengan iron (Fe) yang ada di dalam *S. pneumoniae* membentuk hidroksil radikal. Proses pembentukan hidroksil radikal yang dihasilkan oleh ikatan vitamin C dan iron dari *S. pneumoniae* melalui kombinasi siklus Haber Weiss dan reaksi Fenton [7]. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa ikatan antara vitamin C dan iron dari *Mycobacterium tuberculosis* menghasilkan hidroksil radikal yang dapat menyebabkan *DNA-damage* pada bakteri [7].

Radikal hidroksil akan bereaksi langsung dengan asam nukleat dari DNA dengan membentuk 8-hidroksiguanosin yang merupakan senyawa penyebab kerusakan DNA. Radikal hidroksil akan memutuskan salah satu untai DNA sehingga akan menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA bakteri [11].

Metabolisme *S. pneumoniae* akan memproduksi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida merupakan salah satu dari *reactive oxygen species*. Namun hidrogen peroksida yang dihasilkan ini selain berfungsi untuk meningkatkan virulensi dari *S. pneumoniae*, hal ini juga akan memberikan efek yang negatif terhadap *S. pneumoniae* sendiri. Untuk mengatasi stress oksidatif yang berasal dari hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh *S. pneumoniae* sendiri, bakteri ini akan menghasilkan enzim kanonik untuk mendetoksifikasi radikal oksigen atau pemicu timbulnya stress oksidatif [12]. Vitamin C yang diberikan kepada *S. pneumoniae* akan meningkatkan stress oksidatif pada bakteri tersebut.

Pada penelitian ini digunakan klindamisin yang bekerja dalam menghambat sintesis protein bakteri yang bekerja pada ribosom subunit 50S. Namun selain bekerja pada bagian dari bakteri, klindamisin juga akan menghasilkan ROS dalam proses eradikasi bakteri. Saat bakteri *S. pneumoniae* diuji sensitivitasnya terhadap kombinasi klindamisin dan vitamin C pada media MHA, kemungkinan akan terjadi peningkatan dari ROS yang tidak dapat di detoksifikasi dengan enzim kanonik yang dikeluarkan oleh *S. pneumoniae* [12]. Hal ini akan menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA bakteri. Sehingga dapat dikatakan bahwa vitamin C mempengaruhi aktivitas klindamisin saat dikombinasikan dan hal ini akan berefek pada meningkatnya aktivitas antibakteri klindamisin sehingga menghasilkan peningkatan diameter zona hambat.

Beberapa kelemahan dalam penelitian ini antara lain penelitian ini sebatas *in vitro* sehingga tidak dapat mengetahui secara pasti apakah terjadi peningkatan ROS ketika ditambahkan vitamin C. Selain itu, terkadang terjadi penumpukan zona hambat yang terbentuk karena penempelan cakram kertas yang terlalu berdekatan. Bakteri *S. pneumoniae* adalah *fastidious organism* yang membutuhkan nutrisi tertentu yaitu darah untuk tumbuh dan bakteri ini mudah berubah morfologinya, 48 jam tumbuh di media sudah dapat menyebabkan bakteri bentuk kokus ini berubah memipih

menjadi batang. Terjadi beberapa pengulangan penelitian karena bakteri telah berubah morfologi dan berubah sifat sehingga perlu diperbarui lagi bakterinya untuk dilakukan penelitian ulang.

Simpulan dan Saran

Penambahan vitamin C meningkatkan aktivitas klindamisin dalam menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* secara *in vitro*. Konsentrasi vitamin C minimal yang ditambahkan yang dapat meningkatkan aktivitas klindamisin ialah 1,767 mg/ml.

Saran untuk kedepannya ialah perlu dilakukan penelitian untuk menguji sifat antibiofilm vitamin C dengan induksi biofilm pada bakteri, dan perlu pula dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek penambahan vitamin C dalam klindamisin terhadap *S. pneumoniae* secara *in vivo*.

Daftar Pustaka

- [1] Nugroho RK. Faktor Risiko Kolonisasi Penicillin Nonsusceptible *S. pneumoniae* pada Balita. Semarang: Universitas Diponegoro; 2010.
- [2] World Health Organization. Media centre: P n e u m o n i a . [S e r i a l O n - l i n e] . <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/> (19 September 2015); 2006.
- [3] Departemen Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Kesehatan Lingkungan. Pneumonia Balita Pedoman Kader. Jakarta: Depkes; 2007.
- [4] Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. Profil Kesehatan Provinsi Jawa Timur 2012. Surabaya: Dinas Kesehatan Jawa Timur; 2013.
- [5] Setiabudy R. Farmakologi dan Terapi. Edisi 5 Universitas Indonesia. Jakarta : Balai Penerbit FKUI; 2012
- [6] Li S, Taylor KB, Kelly SJ, Jerdzejas MJ. Vitamin C Inhibits the Enzymatic Activity of *S. pneumoniae* Hyaluronate Lyase. Birmingham: JBC; 2001.
- [7] Vilcheze C, Hartman T, Weinrick B, Jacobs WR. Mycobacterium tuberculosis is Extraordinarily Sensitive to Killing by a Vitamin C-Induced Fenton Reaction. New York: NIH; 2013.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Eleventh Edition. USA: CLSI; 2012.
- [9] Dahlan MS. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: Salemba Medika; 2009.
- [10] Mandell W, Anzueto B, Campbell D, Dowell F, Musher N, Torres, et al. Infectious Disease Society of America/ American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumoniae in Adults. Journal of Clinical Infectious Disease. 2007; Vol. 44: S27-72.
- [11] Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. Biokimia Harper. Edisi 27. Jakarta: EGC; 2009.
- [12] Yesilkaya H, Andisi VF, Andrew PW, Bijlsma JJE. *S. pneumoniae* and Reactive Oxygen Species: an Unusual Approach to Living With Radicals. Leicester: University of Leicester UK; 2013.