

## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

## 2.1.1 Klasifikasi

Genus *Staphylococcus* terdiri dari sekurangnya 30 spesies. Tiga spesies utama yang penting secara klinik adalah *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan bentuk koagulasi positif, hal ini membedakannya dengan spesies lain (Brooks *et al.*, 1996; Dzen, 2010).

Taksonomi dari *S. aureus* adalah sebagai berikut.

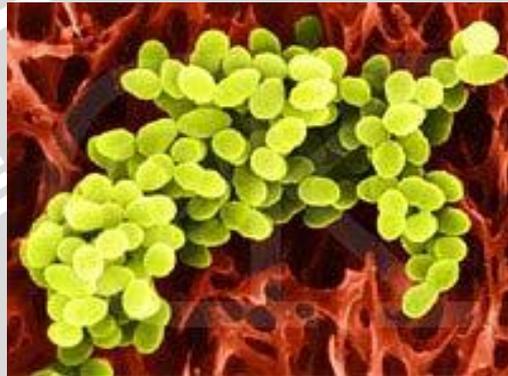
Domain	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Family	: <i>Staphylococcaceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Domrachev <i>et al.</i> , 2008)

## 2.1.2 Karakteristik Kuman

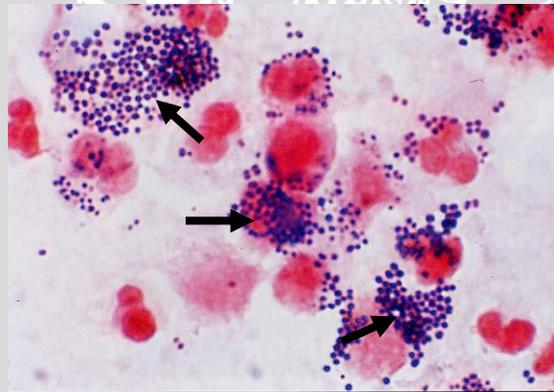
## 2.1.2.1 Ciri-Ciri Organisme

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2  $\mu\text{m}$ , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur (Gambar 2.1 dan gambar 2.2), fakultatif aerob atau anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Koloni pada perbenihan padat

berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri (Jawetz *et al.*, 1995).



**Gambar 2.1. Gambaran Mikrografi Elektron *Staphylococcus aureus* (gambar diproduksi oleh Warwick University USA)**



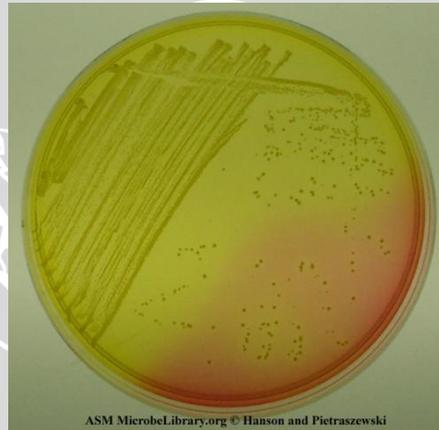
**Gambar 2.2. Panah menunjukkan pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008)**

Akibat pengaruh beberapa zat kimia, misalnya penisilin, *Staphylococcus* bisa kehilangan dinding selnya yang keras dan berubah menjadi bentuk L (protoplas). Protoplas ini bisa berubah kembali menjadi *Staphylococcus* yang berdinding keras jika pengaruh bahan kimia yang bersangkutan dihilangkan dari

lingkungan untuk beberapa waktu. *Staphylococcus* tidak dipengaruhi oleh garam empedu dan optochin (Syahrurachman *dkk.*, 1994).

### 2.1.2.2 Biakan

Untuk membiakkan stafilokokus diperlukan suhu optimal antara 28-38 °C, atau sekitar 35 °C. Apabila bakteri tersebut diisolasi dari seorang penderita, suhu optimal yang diperlukan adalah 37 °C. pH optimal untuk pertumbuhan *S.aureus* adalah 7,4 (Dzen *dkk.*, 2010).



**Gambar 2.3** *Mannitol salt agar* diinokulasi dengan *Staphylococcus aureus* menunjukkan fermentasi mannitol (yellow medium) (sumber: Hanson and Pietraszewski, University of Maine, 2006)

*Nutrient agar plate* (NAP) penting untuk mengetahui adanya pembentukan pigmen dan *S.aureus* akan membentuk pigmen berwarna kuning emas. Koloni yang tumbuh berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat dan konsistensinya lunak (Dzen *dkk.*, 2010).

*S. aureus* dapat dibiakkan pada *blood agar*, pada strain *S.aureus* yang ganas dapat terlihat zona hemolisis yang jernih di sekitar koloni. Bakteri ini dapat memfermentasikan mannitol (gambar 2.3) dan juga toleran terhadap media

dengan 7,5% NaCl. *Mannitol salt agar* digunakan untuk mendeteksi *S. aureus* yang berasal dari feces, makanan, debu, pakaian. Pada media cair didapatkan gambaran kekeruhan yang seragam dengan terdapat endapan seperti bubuk pada dasar tabung (Brooks *et al.*, 2007). Pada umumnya, untuk membiakkan *S. aureus*, perlu medium yang mengandung asam amino dan vitamin-vitamin, misalnya: threonin, asam nikotinat, dan biotin (Dzen *dkk.*, 2010).

### 2.1.2.3 Sifat-sifat Pertumbuhan

*Staphylococcus* memproduksi katalase, yang membedakannya dengan streptococcus. *Staphylococcus* memfermentasikan banyak karbohidrat secara lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik pada masing-masing strain sangat bervariasi. *Staphylococcus* relatif resisten terhadap pengeringan, panas (tahan pada suhu 50°C selama 30 menit) serta terhadap natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh bahan kimia tertentu, seperti heksaklorofen 3% (Brooks *et al.*, 2007).

### 2.1.3 Struktur Antigen

*S. aureus* mengandung Ag-karbohidrat (Ag-KH) dan Ag-protein. Pada strain yang patogen ditemukan Ag-KH tipe A. Apabila Ag-KH tipe A disuntikkan secara intradermal pada penderita yang terinfeksi stafilocokus akan memberikan reaksi hipersensitif tipe cepat (*immediate type*) dalam 20-30 menit berupa wheal dan eritema (Dzen *dkk.*, 2010).

Polisakarida murni yang telah dipisahkan dari kompleks karbohidrat-protein tidak bersifat antigenik dan tidak patogen terhadap kelinci dan tikus putih. Kompleks antigen protein dari stafilocokus bila disuntikkan pada kelinci akan

menghasilkan presipitin, sedangkan protein yang dimurnikan tidak toksik terhadap kelinci bila disuntikkan secara intradermal (Dzen *dkk.*, 2010).

Sebagian besar bakteri *S.aureus* pada dinding selnya mengandung suatu komponen yang disebut protein A. Protein A ini mempunyai berat molekul sekitar 13.000 Da berikatan dengan peptidoglikan secara kovalen. Protein A dapat dikeluarkan ke dalam medium dan juga dapat berikatan dengan fragmen Fc dari imunoglobulin. Berdasarkan sifat ini, *S.aureus* dapat dipakai untuk membantu identifikasi; karena fragmen Fab yang bebas dapat berikatan dengan antigen yang spesifik (Dzen *dkk.*, 2010).

#### 2.1.4 Metabolit dan Faktor Virulensi *S. aureus*

*S. aureus* dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya menyebar luas dalam jaringan dan melalui pembentukan berbagai zat ekstraseluler. Berbagai zat yang berperan sebagai faktor virulensi dapat berupa protein, termasuk enzim dan toksin. *S.aureus* menghasilkan bahan metabolit yang dapat diklasifikasikan dalam tiga bentuk, yaitu metabolit non-toksin, eksotoksin, dan enterotoksin (Dzen, 2010).

##### 2.1.4.1 Metabolit non-toksin

a. Antigen permukaan (materi kapsul)

Berfungsi untuk mencegah fagositosis, mencegah reaksi koagulasi, dan mencegah melekatnya bakteriofaga.

b. Koagulasi

Koagulasi adalah suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang mengandung oksalat atau sitrat. Koagulasi berikatan dengan protrombin dan keduanya menjadi aktif

secara enzimatik dan menginisiasi polimerasi fibrin. Koagulase dapat menyimpan fibrin pada permukaan *staphylococcus*, mungkin merubah ingestinya oleh sel fagositik atau destruksi *staphylococcus* dalam sel-sel tersebut (Brooks *et al*, 2007).

c. Hialuronidase

Dihasilkan oleh 93,6% galur dengan koagulase yang positif, tapi tidak dibentuk oleh galur dengan koagulase negatif. Secara *in vitro*, dapat dihasilkan bila medium diperkaya dengan tirosin dan triptofan. Dengan menghasilkan hialuronidase maka bakteri bersifat invasif, tapi sifat ini terjadi pada fase awal dari infeksi dan cepat dinetralkan pada reaksi peradangan (Dzen *dkk.*, 2010).

d. Stafilokinase (fibrinolisin)

Enzim ini bekerja sebagai aktivator enzim protease dalam plasma untuk menghasilkan *lytic agent*. Enzim ini bersifat antigenik dan tidak tahan panas (Dzen *dkk.*, 2010).

e. Protease

Enzim ini bersifat proteolitik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang diinvasi, termasuk jaringan tulang (Dzen *dkk.*, 2010).

f. Lipase

Enzim ini bersifat antigenik. Pada inokulasi *staphylococcus* koagulase positif galur tertentu pada BAP darah manusia, terlihat pada permukaan koloni terdapat bercak-bercak lemak yang tersusun dari asam oktadekanoat. Ini terjadi karena lipase memutuskan ikatan asam ini dengan lipid (Dzen *dkk.*, 2010).

g. Fosfatase

Fosfatase erat hubungannya dengan patogenitas dan galur koagulase positif biasanya mengandung lebih banyak fosfatase daripada galur negatif, namun hal ini dapat berlaku juga sebaliknya. Oleh karena itu, apabila fosfatase digunakan sebagai indikator patogenitas, nilainya kurang (Dzen *dkk.*, 2010).

h. DNase

DNA ase memecah DNA menjadi fosfomononukleotida dan merupakan suatu protein yang kompak yang terdiri dari rantai polipeptida tunggal dan terdapat pada permukaan sel (Dzen *dkk.*, 2010).

#### 2.1.4.2 Eksotoksin

Eksotoksin yaitu toksin yang disintesis di dalam sel mikroba, kemudian dikeluarkan ke substrat di sekelilingnya. Eksotoksin yang dihasilkan oleh bakteri biasanya bekerja secara spesifik terhadap sel-sel tertentu. Misalnya sel-sel saraf, otot, sel-sel pada saluran pencernaan, dan sebagainya (Zupardi, 1999).

Eksotoksin stafilokokus bersifat mematikan, tidak tahan panas (*thermo labile*), dan dapat menyebabkan nekrosis lapisan dermis (Dzen *dkk.*, 2010). *Alpha toxin* (hemolisin) adalah protein heterogen yang dapat melisis eritrosit, merusak trombosit, pembuluh darah, dan mungkin identik dengan faktor letal dan faktor dermonekrotik eksotoksin. *Beta toxin* merusak spingomyelin dan bersifat racun untuk berbagai jenis sel, termasuk sel darah merah manusia. *Delta toxin* dapat merusak eritrosit manusia dan kuda (Brooks *et al.*, 2007). *Panton-Valentin* (PV) atau Leukosidin adalah toksin *Staphylococcus aureus* yang dapat mematikan sel darah putih pada hewan yang terkena (Melnick *et al.*, 1996).

Bersifat tahan terhadap pemanasan, non hemolitik dan dinetralisir oleh kolesterol (Dzen *dkk.*, 2010).

#### 2.1.4.3 Enterotoksin

Enterotoksin adalah bahan atau zat racun yg dihasilkan oleh jasad renik (basil atau bakteri) yg menimbulkan gangguan pada usus dengan menunjukkan gejala, seperti keracunan makanan. Enterotoksin dihasilkan ketika *S.aureus* tumbuh pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein. Manusia dan kera yang memakan 25 µg enterotoksin akan mengalami muntah dan diare. Efek muntah ini mungkin akibat perangsangan sistem saraf pusat (pusat muntah) setelah toksin bekerja pada reseptor-reseptor dalam usus (Brooks *et al.*, 2007).

#### 2.1.4.4 Toksin Epidermolitik

Toksin ini menyebabkan terjadinya *scalded skin syndrome*. Sindroma ini berupa pengelupasan epidermis kulit sebagai akibat lisisnya perlekatan antar sel pada *stratum germinativum*, tanpa disertai peradangan dan kematian sel.

#### 2.1.4.5 Toxic shock syndrome toxin

Toksin ini menyebabkan terjadinya sindrom klinik berupa panas (febris), ruam kulit, hipotensi bahkan sampai syok. Diperkirakan toksin ini merangsang sel-sel imunokompeten dalam jumlah yang cukup banyak, sehingga digolongkan sebagai super antigen (Dzen *dkk.*, 2010).

#### 2.1.5 Patogenesis dan Patologi

Sebagian bakteri stafilokokus merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. Namun *S. aureus* yang patogen

bersifat invasif, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulasi, dan mampu meragikan manitol (Warsa, 1994).

Bakteri *S. aureus* dapat menyerang seluruh tubuh. Manifestasi klinisnya tergantung dari bagian tubuh yang terkena infeksi seperti pada kulit dapat terjadi furunkel sampai *scalded skin syndrome*, infeksi di kuku yaitu paronikia, osteomielitis pada infeksi tulang, tonsilitis, bronkhitis dan pneumonitis pada infeksi saluran pernapasan. Dari bentuk-bentuk klinis di atas yang sering menimbulkan kematian adalah septisemia, endokarditis, ensefalitis, dan *toxic shock syndrome* atau sindroma syok toksik (SST) (Dzen dkk., 2010).

Kontaminasi langsung *S. aureus* pada luka terbuka (seperti luka pascabedah) atau infeksi setelah trauma (seperti osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka) dan meningitis setelah fraktur tengkorak, merupakan penyebab infeksi nosokomial (Jawetz *et al.*, 1995). Keracunan makanan dapat disebabkan kontaminasi enterotoksin dari *S. aureus*. Waktu onset dari gejala keracunan biasanya cepat dan akut, tergantung pada daya tahan tubuh dan banyaknya toksin yang termakan. Gejala keracunan ditandai oleh rasa mual, muntah-muntah, dan diare yang hebat tanpa disertai demam (Ryan, *et al.*, 1994 ; Jawetz *et al.*, 1995).

Sindroma syok toksik (SST) pada infeksi *S. aureus* timbul secara tiba-tiba dengan gejala demam tinggi, muntah, diare, mialgia, ruam, dan hipotensi, dengan gagal jantung dan ginjal pada kasus yang berat. SST sering terjadi dalam lima hari permulaan haid pada wanita muda yang menggunakan tampon, atau pada anak-anak dan pria dengan luka yang terinfeksi stafilokokus. *S. aureus* dapat diisolasi dari vagina, tampon, luka atau infeksi lokal lainnya, tetapi praktis tidak ditemukan dalam aliran darah (Jawetz *et al.*, 1995).

### 2.1.6 Epidemiologi

Manusia merupakan tempat koloni alamiah dari *S. aureus*. Tigapuluh sampai dengan limapuluh persen manusia dewasa sehat terkolonisasi bakteri ini, dengan 10–30% terkolonisasi secara persisten. Seseorang yang terkolonisasi oleh *S. aureus* akan terjadi peningkatan resiko untuk mendapat infeksi tumpangan lainnya. Rata-rata kolonisasi *staphylococcus* tinggi pada pasien-pasien dengan diabetes mellitus (DM) tipe 1, pengguna obat-obat intravena, menjalani hemodialisis rutin, menjalani pembedahan, *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), sirosis hati dan defek pada kualitas atau kuantitas leukositnya (Samathkumar, 2007). Usia, jenis kelamin, dan tempat tinggal tidak memiliki pengaruh yang bermakna terhadap kejadian infeksi *S. aureus* pada pasien RSUP Dr. Kariadi Semarang periode 2008-2009 (Anna, 2010).

Angka kejadian infeksi bakteri *S.aureus* saat ini telah meningkat dengan pesat dan menjadi masalah kesehatan yang serius karena *S. aureus* juga merupakan penyebab utama pada infeksi nosokomial di rumah sakit pada luka operasi dan infeksi yang terkait dengan *indwelling medical devices* (Todar, 2008).

### 2.2 Biofilm

Biofilm dapat dibentuk oleh satu jenis spesies mikroba, dapat juga terbentuk oleh lebih dari satu jenis mikroba. Selama dalam biofilm, populasi menjalani kehidupan yang kompleks termasuk melakukan berbagai reaksi biokimia dan menghasilkan substrat yang spesifik. Dari segi fisiologi, pada jenis mikroba yang sama, cluster sel yang tumbuh membentuk biofilm berbeda dengan sel planktonik/ sel tunggal. Sel tunggal bersifat *floating* dan berenang pada medium cair, sedangkan sel dalam biofilm harus dapat merespon berbagai faktor termasuk mengenal sisi perlekatan spesifik atau non spesifik yang ada

pada substrat (Hoffman *et al*, 2005; Karatan and Watnick, 2009). Mikroba yang terorganisasi dalam biofilm dapat menghasilkan substansi yang sangat efektif yang tidak dapat dihasilkan secara individual (Matz dalam [www.InfoNIAC.com](http://www.InfoNIAC.com)). Sehingga dipercaya bahwa biofilm merupakan sumber senyawa biokimia baru.

Biofilm telah menjadi bagian yang tak terpisahkan dari siklus hidup prokariot karena telah menjadi strategi penting untuk dispersi membentuk *niche* (gangguan pada permukaan yang seharusnya mulus, khususnya cekungan pada dinding organ berongga, misalnya pada kateter) yang baru, bertahan hidup pada lingkungan ekstrim, serta bertahan terhadap antibiotik, desinfektan, fagosit dan sistem imun.

### 2.2.1 Definisi Biofilm

Biofilm merupakan suatu agregat mikroba sejenis maupun berbeda jenis yang melekat pada permukaan substrat biologis seperti sel, jaringan dan matrik polimer maupun non biologis termasuk substrat sintetik, dimana satu sel dengan sel yang lainnya saling terikat dan melekat pada substrat dengan perantaraan suatu matrik *extracellular polymeric substance* (EPS) atau disebut juga *exopolysaccharide* (Palmer and White, 1999; Hall-Stoodley, 2004; Nuryastuti, 2010). Kemampuan bakteri membentuk biofilm berkorelasi positif dengan tingkat virulensi (kemampuan bakteri untuk menyebabkan penyakit) (Solano *et al.*, 1998).

Biofilm terdiri dari sel-sel mikroorganisme yang melekat erat ke suatu permukaan sehingga berada dalam keadaan diam (*sesil*), tidak mudah lepas atau berpindah tempat (*irreversible*). Pelekatan ini seperti pada mikroba disertai oleh penumpukan bahan-bahan organik yang diselubungi oleh matrik polimer ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroba tersebut. Matrik ini berupa struktur

benang-benang bersilang satu sama lain yang dapat berupa perekat bagi biofilm. Biofilm terbentuk khususnya secara cepat dalam sistem yang mengalir dimana suplai nutrisi tersedia secara teratur bagi mikroba. Pertumbuhan mikroba secara ekstensif disertai oleh sejumlah besar polimer ekstraseluler, menyebabkan pembentukan lapisan biofilm (Jamilah, 2003).

Penelitian tentang biofilm bermula pada tahun 1650, ketika Anthony Von Leeuwenhoek pertama kali menyebutkan biofilm pada tulisannya. Lalu pada 1942, Zobell dapat mendefinisikan biofilm sebagai komunitas prokariotik multiseluler yang berasal dari lingkungan. Namun demikian, biofilm baru disadari keberadaannya oleh peneliti pada tahun 1970. Ketika itu, Costerton menunjukkan peran signifikan biofilm pada penyakit infeksi. Selanjutnya pada awal 90-an, terbukti bahwa biofilm berperan penting dalam kejadian infeksi alat-alat medis. Biofilm dikaitkan dengan kejadian resistensi terhadap antibiotika dan ketahanan terhadap sistem imunitas seluler dan humoral *host*. Untuk mengendalikan biofilm, perlu adanya pengetahuan mengenai struktur biofilm, proses pembentukan biofilm, dan proses regulasi di tingkat molekuler (Pace *et al.*, 2006).

### 2.2.2 Struktur Biofilm

Struktur biofilm secara umum dapat diidentifikasi meliputi: substrat dimana bakteri menempel, film yang terkondisi di atas substrat, matriks biofilm, cairan dan udara. Lapisan film terbentuk dari glikoprotein dan lipid, contohnya protein dari urin pada kateter atau sisa makanan pada gigi. Matriks biofilm merupakan bagian terpenting biofilm, terdiri dari sel bakteri, eksopolisakarida (EPS), dan air. Komponen utama matriks biofilm adalah air (95-99%), sel bakteri hanya sekitar 2-5%, sedangkan EPS sebanyak 2% dari total matriks. Substansi

lainnya yang terkandung dalam matriks meliputi DNA, RNA, protein dan enzim yang total berjumlah 2%. EPS merupakan struktur yang sangat terhidrasi, biopolimer berbentuk gel yang melingkupi bakteri menjadi struktur tiga dimensi yang menjadi karakteristik biofilm dan agregat bakteri. Komposisi EPS tidak hanya penting untuk perlekatan dan stabilisasi matriks, tetapi juga untuk membentuk heterogenitas dan meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam biofilm (Jass *et al.*,2003).

### 2.2.3 Pembentukan Biofilm

Pada prinsipnya dalam pembentukan biofilm dibutuhkan 3 hal, yaitu bakteri, glikokalik, dan permukaan luar sel bakteri. Apabila salah satu dari ketiganya tidak ada, maka biofilm tidak akan terbentuk. Biofilm dapat menjadi sangat sulit untuk dimatikan karena adanya material glikokalik. Banyak infeksi persisten yang terjadi di dalam tubuh disebabkan oleh biofilm bakteri. (Narins, 2003). Menurut Yusuf (2010) diketahui bahwa proses pembentukan biofilm dapat berlangsung hanya dalam beberapa jam.

Mikroba mengembangkan berbagai mekanisme untuk melekat pada substrat. Menurut Aparna dan Yadav (2008), perlekatan mikroba pada substrat tampaknya diinduksi oleh sinyal lingkungan seperti perubahan nutrisi, konsentrasi nutrisi, pH, temperatur, konsentrasi oksigen, osmolaritas, dan besi. Namun jenis sinyal yang dibutuhkan berbeda pada setiap jenis mikroba. Menurut Jamilah (2003), biofilm juga terbentuk karena adanya pembentukan matriks ekstraselular (eksopolimer) yang terdiri dari polisakarida berupa kitin,  $\beta$ -Glukan dan mannoprotein.

Biofilm banyak terbentuk pada permukaan dinding berongga, seperti pada pipa. Menurut Mayette (1992) dalam <http://www.esdstrom.com>, belum

ditemukan mikroba yang tidak mampu membentuk biofilm pada material pipa apapun jenisnya. Mikroba mempunyai kemampuan adhesi yang sama pada semua jenis substrat, seperti *stainless steel*, *Teflon*, *PVC* dan *PVDF (Kynar)*. Oleh sebab itu, kemampuan bakteri dalam menghasilkan berbagai jenis enzim, dalam hal ini ektoenzim dan eksternal enzim, merupakan faktor utama yang sangat penting dalam menginisiasi terbentuknya interaksi antara sel dan substrat (Beech *et al*, 2005).

Banyak jenis bakteri mempunyai adhesin yaitu makromolekul khusus yang berfungsi untuk mengikatkan diri pada reseptor permukaan. Pili adalah salah satunya. Hidrofobisitas dinding sel juga penting dalam meningkatkan afinitas sel terhadap permukaan substrat. Dengan mengubah komposisi lipid dan protein pada outer membran, maka akan terjadi perubahan muatan dan hidrofobisitas sehingga dinding sel menjadi lebih hidrofobik (Mayette, 1992 dalam <http://www.esdstrom.com>). Namun, selain pili dan hidrofobisitas dinding sel, adhesi bakteri pada permukaan dimediasi oleh struktur lain berupa matriks *extracellular polymeric substances (EPS)*.

EPS dapat berupa kapsul sebagai bagian integral dari matriks biofilm, yang kemudian dapat dilepaskan ke lingkungan (media cair) sebagai suatu planktonik atau free EPS. Pada umumnya, EPS yang dihasilkan oleh mikroba merupakan campuran makromolekul kompleks seperti protein, polisakarida, lipid, dan asam nukleat, dimana komposisinya berbeda pada masing-masing jenis mikroba, status fisiologi sel, dan berbagai faktor lingkungan lain (Wingender *et al*, 1999).

Terdapat lima tahap pembentukan biofilm pada substrat.

Tahap pertama. Terbentuknya biofilm dimulai dengan perlekatan sel mikroba planktonik pada permukaan substrat. Meskipun mikroba mempunyai kemampuan adhesi yang sama pada semua jenis substrat, namun sifat permukaan yang kasar lebih disenangi, dan lebih cepat terbentuk pada material hidrofobik seperti teflon dan plastik dibandingkan pada gelas dan logam. Sel-sel pada tahap perlekatan awal tidak melekat dengan kuat karena hanya mengandalkan kekuatan ikatan *van der Waals*. Setelah itu, koloni akan mengikatkan diri lebih kuat pada permukaan dengan menggunakan pili. Selama tahap ini, sel bakteri mengalami pertumbuhan logaritmik (Aparna and Yadav, 2008).

Koloni awal berperan sebagai fasilitator bagi sel lainnya untuk mencari sisi perlekatan selanjutnya sebagai tempat pembuatan matriks biofilm. Bagi sel-sel yang tidak mampu melekat pada permukaan, melalui suatu *quorum sensing* (QS), sel tersebut berperan memacu sel-sel dalam koloni untuk pembentuk matriks (Aparna and Yadav, 2008).

Perlu diketahui bahwa perkembangan dan integritas struktur biofilm sangat tergantung pada QS yaitu molekul ekstraseluler, *pheromon*, yang dapat meningkatkan komunikasi diantara bakteri. Viabilitas atau kelangsungan hidup komunitas biofilm tergantung pada respon gen terhadap stres dan penghantaran sinyal yang diterima melalui QS yang didifusikan (Aparna and Yadav, 2008).

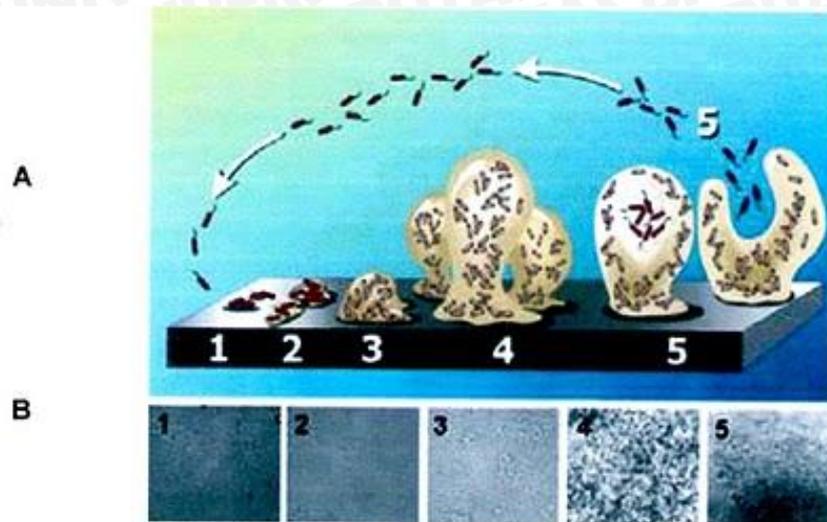
Tahap kedua, bakteri mengalami multifikasi sambil mengeluarkan sinyal kimia untuk berkomunikasi secara internal. Substansi EPS mulai dihasilkan berdasarkan mekanisme genetik. EPS kemudian akan menarik nutrisi dan bakteri planktonik. Agregat sel terbentuk sementara motilitas sel menjadi

semakin menurun sejalan dengan semakin progresifnya lapisan agregat (Aparna and Yadav, 2008).

Tahap ketiga. Selama tahap maturasi, biofilm terus tumbuh sejalan dengan pertumbuhan koloni. Semakin lama biofilm semakin berkembang dengan pertambahan ukuran dan perubahan bentuk (Gambar 2.4). Pada tahap ini, ketebalan biofilm lebih dari 10  $\mu\text{m}$  (Aparna and Yadav, 2008). Perlekatan bakteri akan menjadi ireversibel, dikarenakan oleh interaksi antara protein dan produksi dari EPS.

Tahap keempat. Ketebalan lapisan biofilm pada tahap ini mencapai lebih dari 100mm (Aparna and Yadav, 2008) dan dapat mencapai 300-400 mm (Characklis, 1990 dalam <http://www.esdstrom.com>).

Tahap kelima. Biofilm akan memasuki tahap kelima beberapa hari setelah tahap keempat. Pada tahap ini terjadi *disperse* sel sehingga memungkinkan beberapa bakteri meninggalkan biofilm untuk berkembang kembali menjadi sel planktonik. Pada tahap dispersi, sel-sel dalam koloni akan terlepas sendiri atau bersama sebagian komponen matriks. Pada tahap ini, matriks ekstraseluler biofilm akan didegradasi oleh enzim *dispersi B* dan *deoxyribonuclease* (Kaplan *et al*, 2003; Izano *et al*, 2008), sekaligus enzim tersebut dapat dimanfaatkan sebagai agen anti-biofilm (Kaplan *et al*, 2004; Xavier *et al*, 2005). Pada *Pseudomonas aeruginosa* dan *Candida albicans*, asam lemak *cis-2-decenoic acid* diketahui mampu menginduksi dispersi dan menghambat pertumbuhan koloni biofilm (Davies *et al*, 2009). Beberapa penelitian terakhir menyebutkan bahwa biofilm memiliki struktur yang kompleks dan dinamis.



**Gambar 2.4 Pembentukan Biofilm (Davies, D., 2003)**

Keterangan:

A) Perkembangan biofilm pada substrat. B) Photomicrograph perkembangan biofilm. Terdapat 5 tahap pembentukan biofilm yaitu 1) perlekatan awal pada substrat, 2) perlekatan irreversibel, 3) maturasi I, 4) maturasi II, dan 5) dispersi. Matrik biofilm tersusun dari EPS, protein, dan DNA, dimana EPS tersusun dari 50-90% karbon organik. Pada masing-masing tahap diperlukan komponen dan molekul yang berbeda dalam peranannya membentuk biofilm, misalnya flagellae, pili type IV, DNA, dan eksopolisakarida. (gambar: <http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/biofilms.htm>)

#### 2.2.4 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm

Biofilm akan terbentuk pada permukaan yang lembab, hal ini disebabkan mikroba dapat bertahan hidup jika ia mendapatkan kelembaban yang cukup. Pada prosesnya biofilm mengeksresikan suatu bahan yang licin (berlendir) pada sebuah permukaan, kemudian akan menempel dengan baik di permukaan tersebut jika keadaan minimum bakteri tersebut terpenuhi. Beberapa lokasi yang dapat dijadikan tempat hidup biofilm meliputi material alami di atas dan di bawah tanah, besi, plastik dan jaringan sel. Selama kita dapat menemukan kombinasi nutrisi, air dan sebuah permukaan yang tidak mengandung senyawa beracun, disana sangat mungkin kita temukan biofilm (Lappin-Scott, 2003).

Pembentukan biofilm juga dipengaruhi oleh beberapa faktor dari lingkungan yang bisa berpotensi menjadi toksik untuk sel bakteri. Bakteri yang

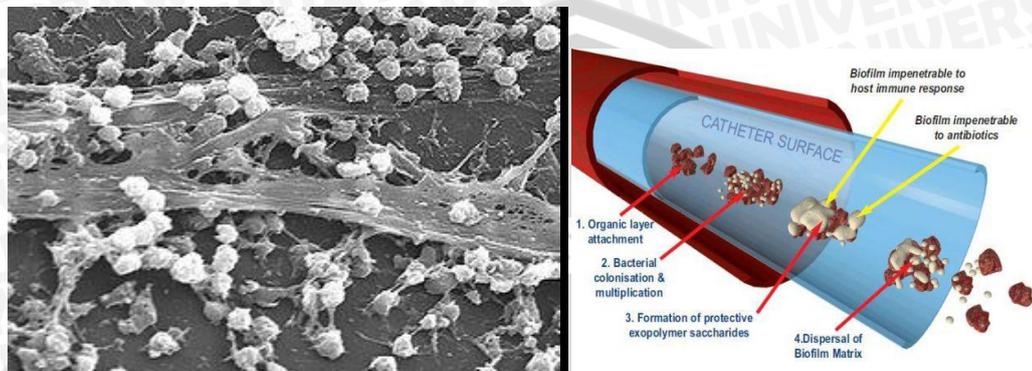
terpapar osmolaritas yang tinggi, suhu yang tinggi, detergen, urea, dan adanya *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) konsentrasi dari antibiotik tertentu, glukosa dan *oxidative stress*, menunjukkan peningkatan ekspresi dari *ica* dan pembentukan biofilm (Nuryastuti, 2010).

### 2.2.5 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis

Dibidang kesehatan biofilm dikenal sangat berbahaya karena menjadi penyebab dari 80% penyakit. Biofilm di kateter dan peralatan kesehatan lainnya bisa menyebabkan infeksi dan bahkan juga penolakan implant. Beberapa penyakit yang disebabkan biofilm adalah dental caries, periodonitis, endocarditis, infeksi paru, infeksi kandung kemih, infeksi yang terkait dengan peralatan artifisial (implant). Di lain pihak di dalam sistem pencernaan, terutama di usus besar keberadaan biofilm sangat bermanfaat bagi kesehatan (PERMI, 2010). Masalah yang ditimbulkan biofilm pada alat medis dapat menyebabkan kerusakan alat, terjadinya infeksi berulang, dan resistensi antibiotik.

Sekitar 80% dari semua penyakit infeksi mikrobial pada manusia diketahui berhubungan dengan biofilm (<http://grants.nih.gov.html>). Misalnya, infeksi saluran urin, infeksi catheter (Gambar 2.5), infeksi telinga tengah, pembentukan *dental plaque* dan gingivitis (Karatan and Watnick, 2009), terbentuknya lapisan pada lensa kontak (Imamura *et al*, 2008), endocarditis, infeksi cystic fibrosis, dan infeksi permanen pada sambungan *prosthetic heart valves* (Lewis, 2001; Parsek and Singh, 2003). Pada hampir 80% dari seluruh pasien pengidap sinusitis kronis, ditemukan biofilm pada jaringan sampel operasinya yang ditandai dengan cilia dan sel goblet yang tidak normal (cenderung seperti hilang/lebih pendek) (Sanclement *et al*, 2005). Contoh lainnya mengenai hubungan biofilm dengan penyakit gigi adalah dental caries. Polimer

air ludah dan produk ekstraseluler bakteri biofilm akan membentuk *dental plaque* pada gigi semua jenis hewan. (Apicella *et al*, 2010).



**Gambar 2.5 Biofilm *Staphylococcus aureus* di dalam selang kateter (sumber: Bosma, *et al.*, 2009 dan Wikipedia, 2011)**

### 2.2.6 Resistensi terhadap Antimikroba

Biofilm juga merupakan suatu jenis pertahanan sel. Berdasarkan studi *in vitro*, mikroorganisme dalam bentuk biofilm dapat menghindari sistem pertahanan inang dan lebih resisten terhadap serangan zat antimikroba 10 – 1.000 kali dibandingkan dalam keadaan sel planktonik (Monroe, 2007).

Bakteri membentuk biofilm untuk mendongkrak daya hidup (*survival*) dan pertumbuhannya. Biofilm juga berfungsi sebagai mekanisme pertahanan fisik bagi bakteri karena bersifat licin, sehingga ia terhindar dari gerusan yang seharusnya dapat menyapu bersih sel-sel yang tidak menempel. Secara kimiawi, biofilm mampu membentengi bakteri dari penetrasi senyawa yang beracun bagi dirinya, seperti antibiotik dan beberapa jenis desinfektan (Aryani, 2012).

Biofilm menjaga kesatuan formasinya dengan saling berikatan satu sama lain pada untaian molekul gula. Hal tersebut yang kemudian disebut sebagai EPS atau *extracellular polymeric substance*, yaitu terbentuknya polimer antar biofilm, sehingga kemungkinan untuk melepas menjadi sulit. Karena dengan

mengekskresikan EPS ini, masing-masing biofilm sangat mungkin saling mendukung untuk berkembang dalam dimensi yang kompleks dan sangat erat (utuh). Matriks yang terbentuk dengan EPS ini akan melindungi sel dan memudahkan komunikasi antar sel melalui isyarat biokimia. Beberapa biofilm berada dalam fasa cair, dimana keadaan tersebut membantu sel dalam mendistribusikan zat yang dibutuhkan dan memberi sinyal molekul pada sel. Matriks ini cukup kuat, oleh sebab itu pada kondisi-kondisi tertentu, biofilm dapat berwujud padat. Masing-masing layer dalam biofilm akan mempunyai ketebalan yang berbeda, hal ini sangat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan tumbuhnya (Lappin-Scott, 2003).

Menurut Gracia *et al* (1997) resistensi antibiotik terhadap biofilm *S.aureus* dapat dijelaskan dengan 2 hal, yakni 1) antibiotik tidak mencapai bakteri yang ada di lapisan yang lebih dalam pada biofilm karena kesulitan migrasi melintasi *exopolysaccharide gel* (EPS), dan 2) bakteri di lapisan dalam biofilm mungkin berada pada keadaan metabolik yang membuatnya tidak mempan dengan antibiotik.

Tingginya persentase keterlibatan biofilm dalam berbagai penyakit infeksi disebabkan karena adanya berbagai mekanisme patogenik yang dikembangkan oleh biofilm, antara lain: 1) melekat pada permukaan substrat, 2) membelah dengan intensitas tinggi untuk meningkatkan efisiensi metabolik komunitasnya, 3) menghindari dari mekanisme fagositosis inang, 4) meningkatkan jumlah sel, 5) mengubah gennya sehingga menjadi gen yang virulen, 6) memproduksi toksin dalam jumlah banyak, 7) memproteksi diri dari agen antimikroba, dan 8) menyebarkan dan mentransmisi agregat ke tempat yang baru (Aparna and Yadav, 2008).

Chlorinasi terhadap biofilm seringkali gagal karena hanya dapat membunuh bakteri pada lapisan bagian luar biofilm. Resikonya bila agen antibakteri diaplikasikan berulang-ulang dapat meningkatkan resistensi biofilm (Hidayati, 2011).

### 2.2.7 Epidemiologi

Biofilm *S. aureus* sering menyebabkan infeksi kronis pada pasien dengan *implanted medical devices*, beberapa diantaranya adalah *Central Venous Catheter* (CVC) dan kateter urin. Pasien dengan pemakaian kateter urin jangka waktu pendek (sampai 7 hari) sekitar 10-50% mengalami infeksi. Sedangkan pasien dengan pemakaian kateter urin jangka waktu panjang (lebih dari 28 hari) hampir semuanya mengalami infeksi (Donlan *and* Consterton., 2002). Setelah diteliti, dari sampel urin pasien dengan infeksi akibat kateter urin, 83,3% merupakan *strain S.aureus* penghasil biofilm (Gad *et al.*, 2009). Sedangkan pada pemasangan CVC yang mempunyai tingkat infeksi mencapai 3-5% (Donlan *and* Consterton *et al.*, 2002), 56,2% merupakan *S.aureus* penghasil biofilm.

### 2.2.8 Tes Pembentukan Biofilm

#### 2.2.8.1 Metode Tabung

*S. aureus* yang sudah teridentifikasi ditanam dalam Nutrient Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada Nutrient Broth ditanam kembali pada NAP kemudian diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam dimasukkan ke tabung TSBglu (10mL) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Lalu tabung dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%)

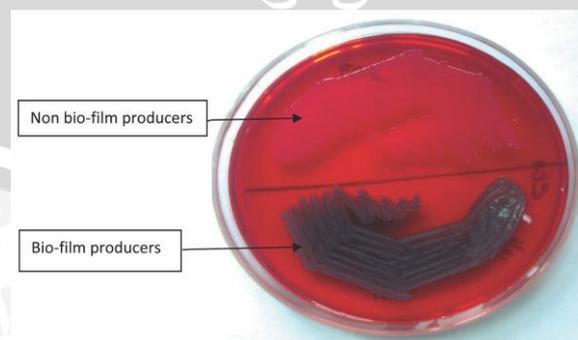
dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Tabung dikeringkan dan dilihat warna sebagai pertanda pembentukan biofilm (Christensen *et al.*,2000).



Gambar 2.6 Tes Pembentukan Biofilm dengan Metode Tabung (Ira, P., 2013)

#### 2.2.8.2 Metode Congo Red Agar (CRA)

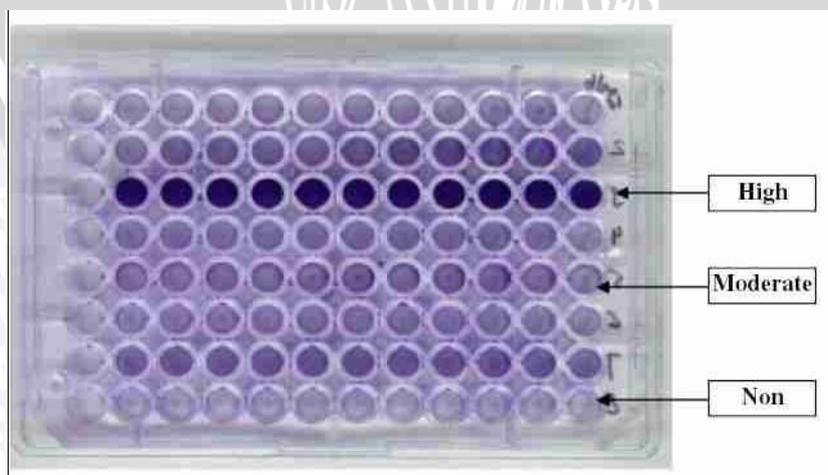
Metode ini digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri memproduksi biofilm. *Agar plate* diberi 5% sukrosa dan *stain Congo Red* (0,8 g/L). Setiap *plate* diinkubasi selama 24 sampai 72 jam dalam suhu 37°C. Hasil yang positif akan ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna hitam dengan konsistensi *dry cristalline* (Moore, 2009).



Gambar 2.7 Tes Pembentukan Biofilm dengan Metode Congo Red Agar (Niveditha, S. dkk, 2013)

### 2.2.8.3 Metode *Microtiter-Plate Test*

Untuk melakukan tes terhadap pembentukan biofilm oleh bakteri *S. aureus* dapat digunakan *microtiter-plate test*. Langkah-langkahnya adalah dengan memindahkan sebanyak 200  $\mu$ l bakteri yang telah dikultur sebelumnya ke dalam sterile *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*. *Well* yang sebagai kontrol negatif hanya diisi oleh *fresh broth*. Kemudian semua plates diinkubasi secara aerobik selama 24 jam dalam suhu 37°C. Setelah itu, isi setiap well di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 250  $\mu$ l *sterile physiological saline*. *Well-plates* di kocok secara kuat untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel. Sisa bakteri yang menempel difiksasi dengan 200  $\mu$ l 99% methanol di setiap *well* selama 15 menit. Kemudian dikosongkan dan dikeringkan. Kemudian setiap *well* dilakukan proses pewarnaan dengan menggunakan 0,2 ml 2% *crystal violet* selama 5 menit. Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan air keran dan dikeringkan. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200  $\mu$ l dari 1M HCl isopropanol di setiap well. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada 595 nm menggunakan spektrofotometer (Nuryastuti, 2010).



Gambar 2.8 Tes Pembentukan Biofilm dengan Metode *Microtiter plate* (Mathur dkk, 2006)

## 2.3 Cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

### 2.3.1 Klasifikasi (Tjitrosoepomo, 2007)

Regnum	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Myrtales</i>
Famili	: <i>Myrtaceae</i>
Genus	: <i>Syzygium</i>
Spesies	: <i>Syzygium aromaticum</i>

Nama lokal cengkeh antara lain: Clove (Inggris), Cengkeh (Indonesia, Jawa, Sunda), ; Wunga Lawang (Bali), Cangkih (Lampung), Sake (Nias); Bungeu lawang (Gayo), Cengke (Bugis), Sinke (Flores); Canke (Ujung Pandang), Gomode (Halmahera, Tidore).



Gambar 2.9 Tanaman Cengkeh (CitraIndonesia.com, 2012)

### 2.3.2 Morfologi dan Ekologi

Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) termasuk jenis tumbuhan perdu yang dapat memiliki batang pohon besar dan berkayu keras, cengkeh mampu bertahan hidup puluhan bahkan sampai ratusan tahun, tingginya dapat mencapai

20-30 meter dan cabang-cabangnya cukup lebat. Cabang-cabang dari tumbuhan cengkeh tersebut pada umumnya panjang dan dipenuhi oleh ranting-ranting kecil yang mudah patah. Mahkota atau juga lazim disebut tajuk pohon cengkeh berbentuk kerucut. Daun cengkeh berwarna hijau berbentuk bulat telur memanjang dengan bagian ujung dan pangkalnya menyudut, rata-rata mempunyai ukuran lebar berkisar 2-3 cm dan panjang daun tanpa tangkai berkisar 7,5 -12,5 cm. Bunga dan buah cengkeh akan muncul pada ujung ranting daun dengan tangkai pendek serta bertandan. Pada saat masih muda bunga cengkeh berwarna keungu-unguan, kemudian berubah menjadi kuning kehijau-hijauan dan berubah lagi menjadi merah muda apabila sudah tua. Sedang bunga cengkeh kering akan berwarna coklat kehitaman dan berasa pedas sebab mengandung minyak atsiri. Umumnya cengkeh pertama kali berbuah pada umur 4-7 tahun. Tumbuhan cengkeh akan tumbuh dengan baik apabila cukup air dan mendapat sinar matahari langsung. Di Indonesia, Cengkeh cocok ditanam baik di daerah daratan rendah dekat pantai maupun di pegunungan pada ketinggian 900 meter di atas permukaan laut (Sentra Informasi Iptek, 2005).

### 2.3.3 Ketersediaan cengkeh

Berdasarkan data statistik perkebunan pada periode 2008-2010, cengkeh di Indonesia tersebar di seluruh Nusantara yang luas totalnya mencapai 437.566 ha. Sentranya adalah daerah Sulawesi Utara seluas 74.620 ha, Sulawesi Tenggara seluas 42.435 ha, Sulawesi Selatan seluas 43.737 ha, Maluku seluas 36.512 ha, Jawa Barat seluas 36.232 ha, Jawa Tengah seluas 35.533 ha, Jawa Timur seluas 36.512 ha, dan untuk daerah-daerah lainnya seluas 20.000 ha (Yuliani dan Satu, 2012).

### 2.3.4 Kandungan Kimia

Aroma cengkeh yang khas dihasilkan oleh senyawa eugenol, yang merupakan senyawa utama (72-90%) penyusun minyak atsiri cengkeh. Eugenol memiliki sifat antiseptik dan anestetik. Selain eugenol, minyak atsiri cengkeh juga mengandung senyawa asetil eugenol, *beta-caryophyllene*, dan vanilin. Terdapat pula kandungan tanin, asam galotanat, metil salisilat (suatu zat penghilang nyeri), asam katekolat, beragam senyawa flavonoid (yaitu eugenin, kaempferol, rhamnetin, dan eugenitin), berbagai senyawa triterpenoid (yaitu asam oleanolat, stigmasterol, dan kampesterol), serta mengandung berbagai senyawa seskuiterpen (Ayoola, 2008).

Cristina (2002) menyatakan hasil pemeriksaan fitokimia pada ekstrak methanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air bunga cengkeh mengandung tannin, polifenol, kuinon dan flavonoid yang diduga senyawa aktif antioksidan.

### 2.3.5 Senyawa Penghambat Biofilm

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa minyak atsiri dari daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm dengan kandungan aktif antibakteri pada minyak atsiri cengkeh yaitu senyawa eugenol (Hertiani *et al.*, 2009). Hasil penelitian Hertiani (2010) menunjukkan bahwa kandungan minyak atsiri cengkeh yang aktif sebagai antibakteri *S. mutans* adalah senyawa fenol (hRf 56, diameter hambatan 6,0 mm).

Niu dan Gilbert (2004) menyatakan bahwa senyawa eugenol dan senyawa sinamaldehida memiliki aktivitas antibiofilm. Kemampuan senyawa-senyawa fenolik dan aldehid untuk menginaktifkan enzim bakteri, kemungkinan

menyebabkan terhambatnya aktivitas enzim glukosiltransferase yang digunakan *S. mutans* untuk mensintesis sukrosa dalam media menjadi glukosa. Akibatnya, pembentukan biofilm juga menjadi terhambat karena glukosa (sebagai media pelekatan bakteri) jumlahnya sedikit atau terbatas. Pembentukan biofilm juga dapat dihambat dengan penghambatan komunikasi mikroba atau penghambatan quorum sensing. Menurut Khan *et al.* (2008), minyak cengkeh mempunyai aktivitas sebagai anti-quorum sensing pada bakteri.

Selain senyawa golongan fenilpropanoid (seperti eugenol dan sinamaldehida), minyak atsiri cengkeh juga mengandung senyawa golongan terpenoid hidrokarbon (seperti  $\alpha$ -pinena dan limonena). Senyawa tersebut dapat terakumulasi dalam jaringan lipid membran sel bakteri, dan menyebabkan terganggunya struktur dan fungsi dari membran sel disebabkan oleh ekspansi (pembengkakan) membran sel dan perubahan permeabilitas membran sel bakteri (Sikkema *et al.*, 1994). Mekanisme dari *terpenoid* diduga dengan disrupsi membran *lipophilic compound* (Cowan, 1999). *Triterpenoid* ini dapat ditemukan pada cengkeh, dengan adanya mekanisme aksi dari *terpenoid* yang bersifat bakteriosidik, diharapkan dapat mengganggu pembentukan biofilm pada *primary attachment*.

Flavonoid pada biofilm yang paling berperan adalah quercetin dan kaempferol. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa keduanya memiliki efek anti inflamasi serta mampu menghambat senyawa adhesin (Hertiani *dkk.*, 2009). Padahal adhesin merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi pembentukan biofilm disamping eksopolisakarida (EPS). Adhesin berperan pada pelekatan sel bakteri di permukaan substrat (Jass *et al.*, 2003). Mekanisme ini

yang akan mengganggu proses pembentukan biofilm karena menghambat pembentukan *polysaccharide intercellular adhesin*.

Aktivitas antimikroba dari *tannin* adalah inaktivasi *adhesin* dan enzim, menghambat pertumbuhan dan menghambat kerja enzim *protease* (Cowan, 1999). *Tannin* dapat dijadikan antibiofilm karena diduga dapat menghambat proses pembentukan biofilm pada tahap *primary attachment* dan *secondary attachment* (Rahmadianti, 2011).

### 2.3.6 Khasiat Cengkeh

Menurut Ayoola, *et, al* (2008) minyak atsiri cengkeh berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter cloaceae*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Citrobacter spp*, dan *Candida albicans*. Khasiat cengkeh antara lain:

1. Analgesik. Minyak atsiri cengkeh digunakan sebagai analgesik (anti nyeri) karena efek eugenol sebagai penghambat siklooksigenase pada metabolisme asam arachidonat sehingga tidak terbentuk mediator kimia dan digunakan sebagai penyakit arthritis, trombosis, atherosclerosis dan dismenorea (Thomson, 2004).
2. Anti inflamasi. Minyak atsiri cengkeh juga digunakan sebagai anti inflamasi karena dapat menghambat migrasi neutrophil dan *N-formyl methionyl-leucyl-phenylalanine* (FMLP) sehingga tidak terjadi kerusakan membran sel (Thomson, 2004).
3. Anti bakteri. Minyak atsiri minyak cengkeh sebagai anti bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap penisilin (Thomson, 2004).

4. Anti virus. Minyak atsiri cengkeh yang terkandung dalam minyak cengkeh menghambat DNA polymerase virus. Eugenol mampu menghambat 50% virus HSV-1 dengan dosis 5 mg/ml (Thomson, 2004).
5. Hepatoprotektif. Minyak atsiri cengkeh mampu melindungi hati dari kerusakan bahan kimia yang diinduksi dari tetrachloride karbon dengan mekanisme sebagai antioksidan dan mencegah lipid peroxidase dan radikal bebas pada konjugasi glutation (Thomson, 2004).

