

## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

## 2.1.1 Taksonomi

**Domain** : Bacteria

**Kingdom** : Bacteria

**Phylum** : Firmicutes

**Class** : Cocci

**Order** : Bacillales

**Family** : Staphylococcaceae

**Genus** : Staphylococcus

**Species** : *Staphylococcus aureus* (Domrachev *et al.*, 2008)

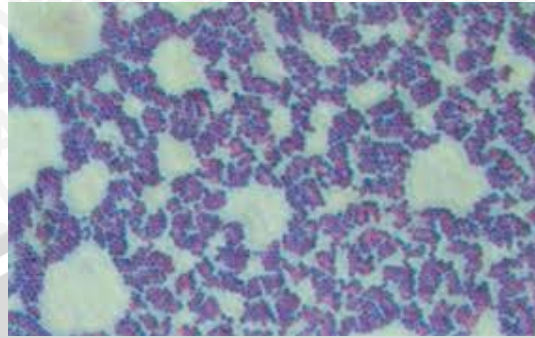
## 2.1.2 Karakteristik Kuman

## 2.1.2.1 Ciri-Ciri Organisme

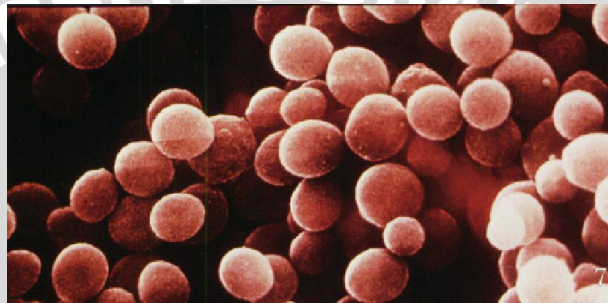
*Staphylococcus aureus* bersifat aerob atau anaerob fakultatif, tes katalase positif, dan tahan hidup di lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi (halofilik), misalnya NaCl 10% (Jawetz *et al.*, 2004).

Sel *Staphylococcus aureus* berbentuk kokus dengan garis tengah sekitar 1  $\mu\text{m}$  dan tersusun dalam kelompok-kelompok tak beraturan. Hasil pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat menunjukkan susunan bakteri yang bergerombol seperti anggur, seperti terlihat pada Gambar 2.1 dan 2.2. Pada biakan cair tampak juga kokus tunggal, berpasangan, tetrad, dan berbentuk rantai. Kokus muda bersifat Gram positif kuat, sedangkan pada biakan yang lebih

tua banyak sel menjadi Gram negatif. *Staphylococcus aureus* tidak bergerak dan tidak membentuk spora (Jawetz *et al.*, 2004).



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008).



Gambar 2.2 Gambaran Mikrografi Elektron *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008).

Dengan pewarnaan Gram, *Staphylococcus aureus* bersifat Gram positif.

Namun, dalam keadaan tertentu dapat pula bersifat Gram negatif, misalnya:

- Organisme yang berasal dari bagian tengah koloni.
- Organisme yang mengalami fagositosis
- Organisme yang berasal dari perbenihan yang sudah tua (Krasner, 2002).

#### 2.1.2.2 Biakan

*Staphylococcus aureus* mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan bakteri dalam keadaan aerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berbentuk bulat, halus, menonjol, dan berkilau. *Staphylococcus aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai



kuning emas tua. *Staphylococcus aureus* juga menghasilkan berbagai tingkatan hemolisis seperti alpha, beta, dan gamma (Dzen dkk, 2003).



Gambar 2.3 Gambaran Biakan Bakteri *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008)

### 2.1.2.3 Sifat-Sifat Pertumbuhan

*Staphylococcus aureus* menghasilkan katalase yang membedakannya dengan *streptococcus*. Bakteri ini meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat, tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi untuk setiap strain. *Staphylococcus aureus* relatif resisten terhadap lingkungan kering dan panas (bakteri ini bisa tahan terhadap suhu 50°C selama 30 menit), serta terhadap natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh zat-zat kimia tertentu seperti heksaklorofen 3% (Jawetz *et al.*, 2004).

Kepekaan *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika dapat terjadi dengan berbagai mekanisme yang berbeda. Diantaranya: (1) sering membentuk enzim *beta lactamase* dibawah kendali plasmid, sehingga resisten terhadap antibiotika *beta lactam*. Plasmid dapat dipindahkan melalui mekanisme transduksi dan mungkin pula melalui konjugasi, (2) terjadinya perubahan genetik pada kromosom yang mengubah reseptor *PBP2 (Penicillin Binding Protein 2)* menjadi *PBP2a* sehingga sulit dicapai oleh antibiotika, (3) toleransi yang berarti bahwa obat dapat menghambat *Staphylococcus aureus* tapi tidak dapat mematikannya, artinya terdapat perbedaan yang sangat besar antara kadar hambat minimal dan

kadar letal minimal suatu obat antimikroba. Toleransi kadang disebabkan oleh adanya proses aktivasi enzim autolitik dalam dinding sel, (4) plasmid dapat pula membawa gen resistensi terhadap tetrasiklin, eritromisin, dan aminoglikosida (Jawetz *et al.*, 2004)

### 2.1.3 Struktur Bakteri

*Staphylococcus aureus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik yang merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel. Peptidoglikan, suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang terangkai, merupakan eksoskeleton yang kaku pada dinding sel. Asam teikoat, yang merupakan polimer gliserol atau ribitol fosfat, berikatan dengan peptidoglikan dan menjadi bersifat antigenik (Krasner, 2004).

Protein A merupakan komponen dinding sel kebanyakan strain *Staphylococcus aureus* yang terikat pada bagian Fc molekul IgG, kecuali IgG3. Bagian Fab pada IgG yang terikat pada protein A bebas berikatan dengan antigen spesifik. Beberapa strain *Staphylococcus aureus* mempunyai simpai yang dapat menghambat fagositosis oleh limfosit polimorfonuklear, kecuali kalau ada antibodi spesifik. Kebanyakan strain *Staphylococcus aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal pada permukaan di dinding sel. Koagulase berikatan secara non-enzimatik dengan fibrinogen sehingga bakteri beragregasi (Jawetz *et al.*, 2004).

### 2.1.4 Toksin dan Enzim

#### 2.1.4.1 Fosfatase

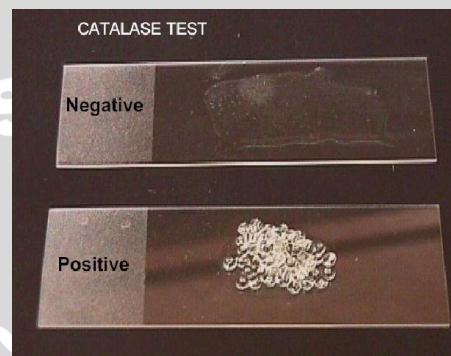
Fosfatase erat kaitannya dengan patogenesitas dan galur koagulase positif pada umumnya menghasilkan lebih banyak fosfatase daripada galur koagulase negatif, namun kadang-kadang ada pula galur koagulase negatif yang



menghasilkan fosfatase lebih banyak. Oleh karena itu, apabila fosfatase digunakan sebagai indikator patogenesitas, nilainya kurang (Dzen dkk,2003).

#### 2.1.4.2 Katalase

*Staphylococcus aureus* menghasilkan katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Katalase membedakan *staphylococcus* dengan *streptococcus* (Jawetz *et al.*, 2004).



Gambar 2.4 Gambaran Tes Katalase *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008).

#### 2.1.4.3 Koagulase

*Staphylococcus aureus* menghasilkan koagulase suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang telah diberi oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor yang banyak terdapat dalam serum. Koagulase dapat menggandakan fibrin di permukaan bakteri, mungkin mengubah pola pemakanan bakteri oleh sel-sel fagosit atau perusakannya dalam sel ini. Bakteri yang membentuk koagulase dianggap mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Jawetz *et al.*, 2004).



**Gambar 2.5** Gambaran Tes Koagulase *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008).

#### 2.1.4.4 Lipase

Enzim ini bersifat antigenik. Pada inokulasi, *staphylococcus* koagulase positif strain tertentu pada BAP darah manusia, terlihat permukaan koloni yang berbercak-bercak lemak yang tersusun dari asam oktadekanoat. Ini terjadi karena lipase memutuskan ikatan asam ini dengan lipid (Jawetz *et al.*, 2004).

#### 2.1.4.5 Protease

Enzim ini bersifat proteolitik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang mengalami invasi, termasuk jaringan tulang (Dzen dkk, 2003).

#### 2.1.4.6 Staphylokinase

Enzim ini bekerja sebagai aktivator enzim protease dalam plasma untuk menghasilkan *lytic agent*. Enzim ini bersifat antigenik dan tidak tahan panas (Dzen dkk, 2003).

#### 2.1.4.7 DNA ase

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,2003).

#### 2.1.4.8 Enzim lain

Enzim lain yang dihasilkan *staphylococcus* adalah hialuronidase, atau faktor penyebar; stafilokinase yang mengakibatkan fibrinolisis tetapi kerjanya jauh lebih lambat daripada streptokinase; proteinase; lipase; dan beta laktamase (Jawetz *et al.*, 2004).

#### 2.1.4.9 Eksotoksin

*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* bersifat non toksik dan dapat merusak eritrosit manusia dan kuda (Jawetz *et al.*, 2004).

#### 2.1.4.10 Leukosidin

Toksin *Staphylococcus aureus* ini dapat mematikan sel darah putih pada hewan yang terkena (Krasner, 2002).

#### 2.1.4.11 Toksin Eksfoliatif

Toksin *Staphylococcus aureus* ini meliputi sekurangnya dua protein yang mengakibatkan deskuamasi menyeluruh pada sindroma lepuh kulit *staphylococcus* (Krasner, 2002).



#### 2.1.4.12 Toxin Syndrome Shock Toxic

Kebanyakan strain *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari penderita sindroma syok toksik memproduksi suatu toksin yang disebut *Toxin Syndrome Shock Toxic-1* (TSST-1), yang sama dengan enterotoksin F dan eksotoksin pirogenik C. Pada manusia toksin ini menyebabkan demam, syok, dan keterlibatan multisistem termasuk ruam deskuamatif (Jawetz *et al.*, 2004).

#### 2.1.4.13 Enterotoksin

Enterotoksin dihasilkan ketika *Staphylococcus 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 syaraf pusat (pusat muntah) setelah toksin bekerja pada reseptor-reseptor dalam usus (Jawetz *et al.*, 2004).

#### 2.1.5 Patogenesis

Kemampuan patogenetik strain *Staphylococcus aureus* tertentu merupakan efek gabungan faktor-faktor ekstraseluler, toksin, serta sifat invasif strain tersebut. *Staphylococcus aureus* yang patogen dan invasif cenderung menghasilkan koagulase dan pigmen kuning, dan bersifat hemolitik. *Staphylococcus aureus* yang berada di hidung dan pada kulit orang sehat merupakan patogen oportunistik yang hanya menginfeksi jaringan atau bagian tubuh yang rusak atau pada orang dengan imunitas yang rendah.

*Staphylococcus aureus* yang patogen dilengkapi dengan enzim (koagulase, lipase, esterase) dan toksin untuk dapat hidup bertahan pada jaringan host. Lesi yang disebabkan *Staphylococcus aureus* dikarenakan invasi pada folikel rambut dan kelenjar lemak oleh enzim lipase, esterase, koagulase, *alpha toxin* dan leukosidin yang melawan reaksi host dan fagositosis. Bahkan

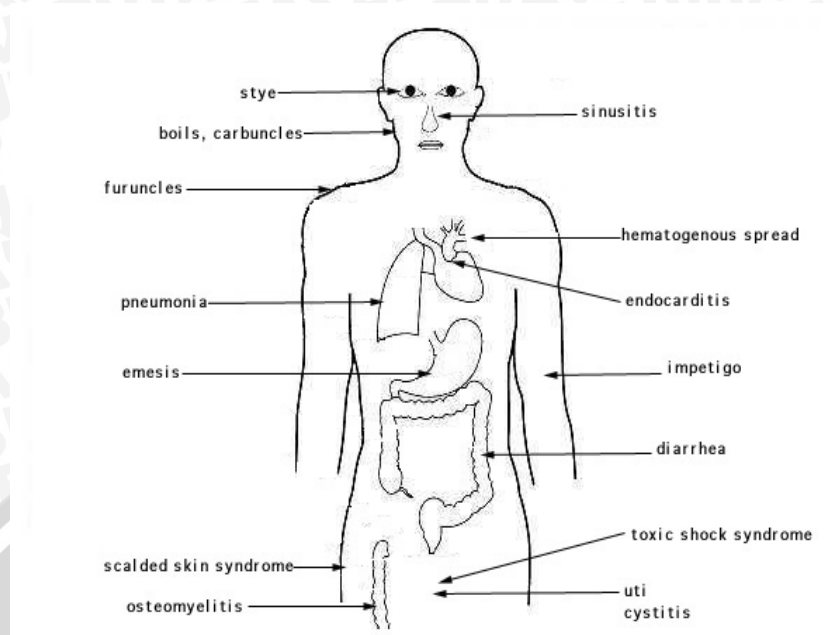


setelah fagositosis, destruksi intraseluler yang difasilitasi oleh komplemen berlangsung tidak sempurna. Resistensi ini dapat menyebabkan infeksi yang kronis (Krasner, 2002).

### 2.1.6 Patologi

Ciri khas lesi *Staphylococcus aureus* adalah furunkel atau abses setempat lainnya. Koloni *Staphylococcus aureus* yang berada dalam folikel rambut dapat menimbulkan nekrosis jaringan (faktor dermonekrotik). Enzim koagulasi dihasilkan dan mengkoagulasi fibrin di sekitar lesi dan di dalam saluran getah bening, mengakibatkan pembentukan dinding yang membatasi proses peradangan. Dinding ini diperkuat oleh penumpukan sel radang dan akhirnya terjadi fibrosis jaringan. Di tengah-tengah lesi, terjadi pencairan jaringan nekrotik (dibantu hipersensitivitas tipe lambat) dan abses mengarah pada daerah yang daya tahannya paling kecil. Setelah cairan di tengah cairan nekrotik keluar, rongga secara pelan-pelan diisi dengan jaringan granulasi dan akhirnya diikuti oleh proses penyembuhan ( Gemmel *et al.*, 2006).

Pernanahan lokal (abses) adalah sifat khas infeksi *Staphylococcus aureus*. Dari setiap fokus, organisme menyebar melalui saluran getah bening dan aliran darah ke bagian tubuh lainnya. Pernanahan vena yang disertai trombosis sering terjadi pada penyebaran tersebut. Pada osteomielitis, fokus primer pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara khas terjadi di pembuluh darah terminal pada metafisis tulang panjang, mengakibatkan nekrosis tulang dan pernanahan menahun. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, empiema, endokarditis, atau sepsis dengan pernanahan pada bagian tubuh manapun seperti pada Gambar 2.6 (Jawetz *et al.*, 2004).



**Gambar 2.6** Lokasi Infeksi dan Penyakit Karena *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008)

*Staphylococcus aureus* juga menyebabkan penyakit melalui kerja toksin, tanpa memperlihatkan infeksi invasif (Jawetz *et al.*, 1996). Bula eksfoliatif (sindroma lepuh kulit) disebabkan oleh toksin eksfoliatif. Sindroma syok toksik berhubungan dengan Toksin Syok Sindrom Toksik –I (TSST-1) (Satari, 2005).

## 2.1.7 Diagnosis Laboratorium

### 2.1.7.1 Bahan

Bahan isolat *Staphylococcus aureus* berasal dari usapan permukaan, nanah, darah, aspirat trakea, atau cairan serebrospinal. Pemilihan bahan untuk biakan bergantung pada lokalisasi proses infeksi (Jawetz *et al.*, 2004).

### 2.1.7.2 Biakan

Bahan yang ditanam pada *Blood Agar Plates* akan menghasilkan koloni yang khas dalam 18 jam pada 37°C. Hemolisis dan pembentukan pigmen dapat



terlihat secara optimal pada suhu kamar, namun mungkin tidak dapat diamati sampai beberapa hari sesudahnya. Bahan yang terkontaminasi flora campuran dapat ditanam dalam perbenihan yang mengandung NaCl 7,5%; garam akan menghambat pertumbuhan kebanyakan flora normal selain *Staphylococcus aureus* (Krasner, 2002).

#### 2.1.7.3 Tes Katalase

Hidrogen peroksida 3 % sebanyak 0,2 mL dituangkan ke dalam tabung reaksi. Sedikit biakan bakteri diambil dengan menggunakan ose, dan dipaparkan ke atas permukaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian digoyangkan dengan pelan dan diamati dalam waktu 10 detik. Pembentukan gelembung udara (pelepasan oksigen) menunjukkan tes positif (*Health Protection Agency*, 2010).

Tes juga dapat dilakukan dengan menuangkan larutan hidrogen peroksida di atas bakteri yang tumbuh subur pada *slant agar* dan meneliti gelembung yang muncul (Dzen dkk, 2003).

#### 2.1.7.4 Tes Koagulase

Plasma kelinci atau manusia yang telah diberi sitrat dan diencerkan 1:5 dicampur dengan biakan bakteri dalam medium yang sama banyaknya dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Sebagai kontrol, dalam satu tabung lainnya dicampurkan plasma dan medium steril, kemudian diinkubasi. Jika terjadi pembekuan dalam waktu 1-4 jam, menandakan tes itu positif. Kepentingan dari tes ini adalah untuk membedakan antara *staphylococcus* koagulase positif (*Staphylococcus aureus*) dan *staphylococcus* koagulase negatif. Semua *staphylococcus* yang bersifat koagulase positif dianggap patogen bagi manusia (Jawetz *et al.*, 2004).

### 2.1.7.5 Tes Kepekaan Antibiotika

Tes kepekaan antibiotika dengan metode dilusi medium atau difusi *agar plate* sebaiknya dilakukan secara rutin pada isolat *Staphylococcus* yang berasal dari klinik. Resistensi terhadap penisilin G dapat diperkirakan dengan tes  $\beta$ -lactamase positif. Sekitar 90% *Staphylococcus aureus* akan menghasilkan  $\beta$ -lactamase. Resistensi terhadap nafsilin terjadi pada 10-20% isolat *Staphylococcus aureus*. Resistensi nafsilin berkorelasi dengan adanya gen *Mec-A* yang menyandi protein terikat penisilin yang tidak dipengaruhi oleh antibiotika ini. Gen dapat dideteksi dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), tetapi hal ini tidak berguna karena *Staphylococcus* yang tumbuh pada *Muller Hinton Agar* (mengandung 4% NaCl dan 6  $\mu$ g/mL oksasilin), secara khas mengandung gen *Mec-A* dan resisten terhadap oksasilin (Jawetz *et al.*, 2004).

### 2.1.7.6 Tes Serologis dan Penentuan Tipe

Antibodi terhadap asam teikoat dapat dideteksi pada infeksi *Staphylococcus aureus* yang kronis (misalnya endokarditis). Tes serologis ini hampir tidak mempunyai nilai praktis (Dzen dkk, 2003).

Pola kepekaan antibiotika dapat membantu untuk melacak infeksi *Staphylococcus aureus* dan menentukan apakah isolat bakteri dari biakan darah mewakili bakteremia yang disebabkan strain yang sama, yang berasal dari satu tempat infeksi (Guerrant, 2006).

Penentuan tipe faga hanya dipakai untuk melacak infeksi dalam penelitian epidemiologi pada wabah infeksi *Staphylococcus aureus* yang luas, yang dapat terjadi di rumah sakit (Jawetz *et al.*, 2004).



### 2.1.8 Transmisi dan Pengendalian

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri patogen oportunistik yang dapat ditemukan dimana-mana. Sumber utama infeksi adalah luka-luka pada manusia, alat-alat medis yang terkontaminasi bakteri, saluran pernapasan, serta kulit manusia. Penyebaran infeksi melalui kontak langsung bertambah penting bila terjadi di rumah sakit, karena bakteri yang mengkolonisasi sebagian besar karyawan dan penderita bersifat resisten terhadap antibiotika. Kebersihan, higienitas, dan penanganan lesi secara aseptik dapat mengendalikan penyebaran bakteri dari lesi, tetapi penanganan tersebut sulit dilakukan bila sumber infeksi berasal dari karier (Jawetz *et al.*, 2004).

Daerah yang paling rawan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* di rumah sakit adalah kamar perawatan bayi baru lahir, unit perawatan intensif, ruang bedah, dan bagian kemoterapi kanker. *Staphylococcus aureus* patogen “epidemik” masuk secara besar-besaran ke daerah-daerah ini dan dapat menyebabkan infeksi nosokomial yang berbahaya. Karyawan dan pengunjung dengan lesi *Staphylococcus aureus* yang aktif dan karier mungkin harus dilarang memasuki daerah ini. Pada orang-orang ini, pemakaian antiseptik topikal di hidung atau daerah perineal dapat mengurangi penyebaran bakteri. Rifampin yang diberikan bersama dengan obat anti *staphylococcus* oral yang lain kadang-kadang dapat menekan keadaan karier dalam jangka panjang dan mungkin dapat menyembuhkan karier ini; bentuk ini dicadangkan untuk karier *staphylococcus* yang sulit diatasi dengan cara lain karena *staphylococcus* cepat resisten terhadap rifampin. Selain itu, antiseptik seperti heksaklorofen dapat dipergunakan pada kulit bayi baru lahir untuk menghilangkan koloni *staphylococcus* tetapi sifat toksisitasnya membuat antiseptik ini tidak digunakan secara luas (Guerrant, 2006).

## 2.2 Biofilm

### 2.2.1 Pengertian Biofilm

Biofilm merupakan komunitas mikroorganisme kompleks yang menempel pada permukaan substrat, diliputi oleh matriks eksopolisakarida mikroba, dan berbentuk sebuah struktur tiga dimensi yang terorganisir. Mikroorganisme yang tumbuh dalam biofilm dapat menyebabkan infeksi yang kronis, kolonisasi pada alat-alat medis, serta menimbulkan plak pada gigi. Baik permukaan abiotik maupun biotik seperti mineral, logam, jaringan hewan dan tumbuhan, paru dan usus, serta alat-alat medis menjadi subjek kolonisasi dan pembentukan biofilm (Jass *et al.*, 2003).

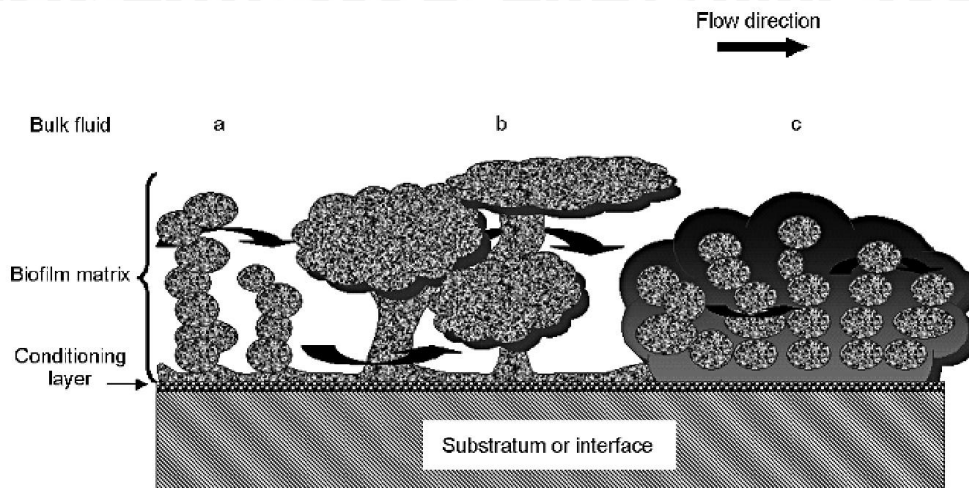
Penelitian tentang biofilm bermula pada tahun 1650, ketika Anthony Von Leeuwenhoek pertama kali menyebutkan biofilm pada tulisannya. Lalu pada 1942, Zobell dapat mendefinisikan biofilm sebagai komunitas prokariotik multiseluler yang berasal dari lingkungan. Namun demikian, biofilm baru disadari keberadaannya 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

Terdapat keberagaman struktur dan arsitektur biofilm. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi fisik (jenis permukaan dan pH), kondisi lingkungan (suhu, kelembaban, dll), nutrisi, dan status fisiologis mikroorganisme. Struktur biofilm secara umum yang 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 urine 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 memerangkap 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. Pada lingkungan yang bernutrisi tinggi, bakteri dalam biofilm cenderung membentuk lebih banyak EPS dan sel, sehingga terbentuk struktur yang lebih tebal. Pada keadaan sedikit nutrisi, biofilm menjadi lebih tipis dan strukturnya terpisah-pisah dengan kanal air, hal ini menyebabkan mudahnya perpindahan massa ke dalam biofilm. Lingkungan yang heterogen memudahkan bakteri untuk mengatur pertukaran nutrisi yang optimal, mengatur pembuangan sisa metabolisme, dan mengatur stabilitas sel, dengan kata lain heterogenitas membantu pertumbuhan dan pertahanan bakteri (Jass *et al.*, 2003).

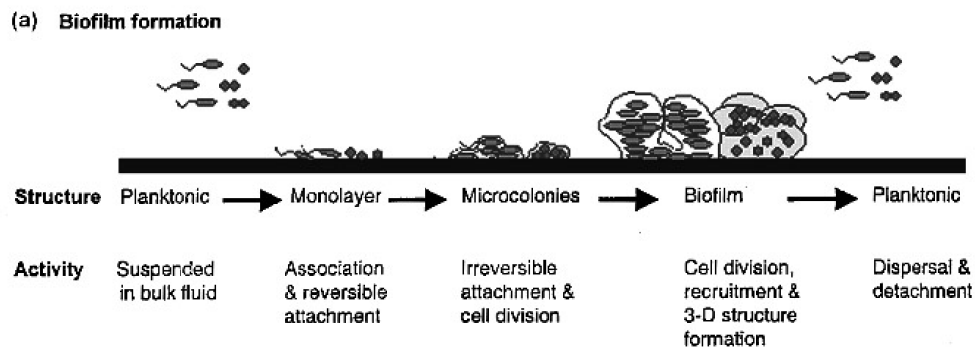


**Gambar 2.7** Ilustrasi Tiga Varian Struktur Matriks Biofilm (a) biofilm yang berbentuk mosaik heterogen, (b) biofilm dengan matriks yang berongga (porous), dan (c) biofilm dengan konstituen yang tebal (Jass *et al.*, 2003).

Terdapat tiga variasi struktur matriks biofilm seperti yang dapat terlihat pada Gambar 2.7: biofilm yang berbentuk mosaik heterogen, biofilm dengan matriks yang berongga (porous), dan biofilm dengan konstituen yang tebal. Mosaik heterogen adalah biofilm dengan bakteri yang membentuk lapisan basal setebal 5 mm dan struktur pilar besar setebal 100 mm. Biofilm seperti ini muncul pada kondisi rendah nutrisi dan mengandung bakteri patogen seperti *Legionella pneumoniae*. Pada matriks biofilm yang porous akan terbentuk struktur seperti jamur dengan kanal-kanal air. Struktur seperti ini memudahkan perpindahan mater dan nutrisi dari medium sekitar ke dalam biofilm. Variasi ketiga adalah biofilm dengan konstituen tebal, struktur ini biasanya ditemukan pada plak gigi. Perbedaan-perbedaan struktur tersebut terjadi akibat kombinasi dari faktor fisik, ketersediaan nutrisi, dan keberagaman populasi bakteri. Dalam ruang lingkup medis, biofilm lebih sering diidentifikasi dari fenotip dan aspek fisiologisnya daripada dari sisi struktur selnya (Jass *et al.*, 2003).



### 2.2.3 Pembentukan Biofilm



Gambar 2.8 Tahap-Tahap Pembentukan Biofilm (Jass *et al.*, 2003).

Pembentukan biofilm merupakan sebuah proses dinamis yang kompleks. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa biofilm dapat terbentuk dalam berbagai ekosistem dengan mekanisme pembentukan yang sama. Lapisan perlekatan biasanya mengandung air, lemak, albumin, matriks polimer ekstraseluler, atau nutrisi lain yang berasal dari lingkungan sekitar. Pada awalnya, bakteri melekat pada permukaan secara reversibel lalu menjadi perlekatan irreversibel, lama kelamaan biofilm menjadi struktur kompleks. Biofilm yang matur biasanya terdiri dari struktur berbentuk jamur yang mengendap di dalam matriks polimer ekstraseluler atau glikokaliks, diantara struktur tersebut terbentuk sebuah kanal berisi air yang memungkinkan adanya aliran nutrisi dan oksigen ke dalam bagian dalam biofilm serta aliran ekskresi sisa metabolisme sel. Proses perlekatan bakteri pada permukaan ditentukan oleh berbagai variabel, seperti spesies bakteri, komposisi permukaan sel, jenis permukaan, persediaan nutrisi, hidrodinamik, komunikasi antar sel, dan gen pengatur biofilm. Setidaknya terdapat tiga fase yang terlibat dalam proses pembentukan biofilm. Fase pertama dicirikan sebagai proses penyebaran perlekatan sel pada

permukaan. Fase kedua merupakan masa pembelahan sel, sedangkan fase ketiga adalah masa agregasi sel-sel menjadi bentukan biofilm (Pace *et al.*, 2006).

#### **2.2.3.1 Perlekatan Reversibel**

Perlekatan ini melibatkan interaksi antara bakteri dan permukaan polimer yaitu : elektrostatis, hidrofobik, steric hindrance, faktor van der Waals, temperatur, dan faktor hidrodinamik. Keadaan fisik, kimia, dan biologi berperan penting pada interaksi awal sel bakteri pada permukaan substrat. Sel planktonik diduga berkontak dengan permukaan substrat melalui mekanisme kemotaksis dan motilitas. Motilitas bakteri penting pada proses perlekatan dan penyebaran bakteri. Jumlah perlekatan bakteri pada substrat dipengaruhi oleh hidrofobisitas yang dipengaruhi oleh protein permukaan sel bakteri (Jain, 2008).

#### **2.2.3.2 Perlekatan Ireversibel**

Setelah melekat pada permukaan, bakteri membentuk matriks ekso-polimerik sehingga terjadi perlekatan ireversibel, proliferasi, dan akumulasi kluster sel. Matriks ekstraseluler, yang terdiri dari polisakarida, protein, asam nukleat, dan substansi lainnya, berfungsi untuk memadatkan sel-sel bakteri menjadi biofilm, membantu penangkapan nutrisi, dan melindungi sel dari dehidrasi dan antibiotika (Jain, 2008).

#### **2.2.3.3 Maturasi Biofilm**

Setelah bakteri melekat secara ireversibel, sel-sel mulai melakukan perubahan fenotip, dan proses maturasi biofilm pun dimulai. Awalnya, bakteri membentuk mikrokoloni melalui agregasi sel, pembelahan sel, dan penarikan sel planktonik. Sel-sel yang telah melekat mengeluarkan sejumlah komponen ekstraseluler yang berinteraksi dengan molekul organik dan inorganik yang



berasal dari lingkungan, selanjutnya terbentuklah glikokaliks. Pada pemeriksaan mikroskopis terlihat bahwa biofilm membentuk struktur tiga dimensi yang kompleks. Mikrokoloni dapat dianggap sebagai unit dasar dari biofilm, sama halnya jaringan yang membentuk tubuh organisme. Kanal air pada biofilm dapat dianalogikan sebagai sistem sirkulasi yang primitif. Nutrisi pada biofilm disalurkan melalui kanal air ini dengan kecepatan aliran yang lambat sehingga dapat dimanfaatkan secara optimal. Dalam satu spesies yang sama, biofilm dapat memiliki struktur dan keadaan metabolik yang berbeda. Hal ini menyebabkan terbentuknya banyak tipe fenotip yang replikatif, heterogenitas ini dimanfaatkan biofilm untuk tahan terhadap berbagai stres lingkungan, serangan imun host, dan antimikroba (Pace *et al.*, 2006).

#### **2.2.3.4 Pelepasan/ Detachment Biofilm**

Pada tahap ini biofilm yang sudah terbentuk dapat mengalami pelepasan sel secara erosi atau sloughing. Erosi terjadi secara berkala karena geseran dari cairan yang mengalir. Sloughing adalah pelepasan banyak sel yang terjadi secara acak karena adanya perubahan dalam medium pertumbuhan. Bakteri yang terlepas ini kemudian dapat menyebar dan menempel kembali pada permukaan lain yang masih steril dan membentuk biofilm yang baru. Proses pembentukan dan pelepasan biofilm merupakan sebuah siklus yang terus berjalan. Faktor-faktor penyebab lain pelepasan biofilm adalah kurangnya nutrisi sel, ekspresi alginate lyase yang berlebihan, hilangnya eksopolisakarida (EPS), dan komunikasi antar sel (Jain, 2008).

#### **2.2.4 Infeksi Biofilm pada Alat Medis**

Beberapa dekade belakangan ini, penggunaan alat-alat medis seperti kateter urinaria dan vaskular, sendi prostetik, katup jantung, *pacemaker*,

*endotracheal tube*, implan payudara, lensa kontak, dan implan gigi telah menjadi hal yang biasa ditemui dalam praktik klinis. Saat ini, sekitar 200 juta kateter telah dipakai untuk menangani berbagai penyakit di Amerika Serikat. Alat medis ini biasanya dilingkupi oleh jaringan dan cairan tubuh seperti darah, saliva, urine, dan cairan sendi. Di dalam cairan tubuh tersebut terkandung platelet, plasma, dan protein seperti fibrin, fibronektin, kolagen, dan laminin. Molekul-molekul ini dapat melekat pada alat medis dan membentuk suatu lapisan film glikol berprotein. Flora normal komensial merupakan sumber potensial bagi kolonisasi dan pembentukan biofilm. Contohnya flora komensial kulit seperti *Staphylococcus epidermidis* dapat bermigrasi dari kulit tempat masuknya kateter menuju subkutan dan membentuk biofilm. Mikroorganisme dominan yang dapat membentuk biofilm pada alat medis antara lain staphylococci koagulase-negatif, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* Gram negatif, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, dan *Candida* spp. Staphylococci koagulase negatif, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida* spp. sering menyebabkan infeksi implan intrakardiak berupa endokarditis, sedangkan infeksi implan sendi terutama disebabkan oleh *S. epidermidis* dan *Staphylococcus aureus* (Pace et al., 2006).

### **2.2.5 Resistensi Bakteri Terhadap Antibiotika yang Diperantarai oleh Biofilm**

Resistensi antibiotika yang diperantarai oleh biofilm saat ini telah menjadi masalah medis baru. Biofilm dapat menimbulkan resistensi antibiotika tiga kali lebih banyak dibandingkan sel bakteri planktonik. Paska pemberian antibiotika dengan dosis bakterisidal, sebuah populasi kecil bakteri yang selamat dapat berkoloni pada permukaan substrat, dan membentuk strain bakteri yang lebih resisten terhadap terapi antibiotika. Namun, bila sel bakteri tersebut



melepaskan diri dari biofilm, maka sel bakteri berubah kembali menjadi sel yang sensitif terhadap antibiotika. Sejumlah faktor yang mungkin menyebabkan resistensi telah diteliti, diantaranya adalah pembentukan penahan difusi terhadap bahan kimia yang diperantarai oleh glikokaliks; interaksi eksopolimer dengan antibiotika; pertumbuhan lambat sel bakteri; hipermutasi sel; keadaan multiseluler; dan ekspresi gen resistensi tertentu (Pace *et al.*, 2006).

#### **2.2.5.1 Penetrasi Lambat oleh Eksopolimer Biofilm**

Matriks ekstrapolimer biofilm seperti eksopolisakarida (EPS) memiliki potensi dalam mengurangi penetrasi antibiotika dan biosida melalui mekanisme perlambatan difusi atau bereaksi langsung dengan antibiotika. EPS bertindak sebagai penukar ion dan penahan antibiotika hidrofilik seperti aminoglikosida. Contohnya pada biofilm *P. aeruginosa*, baik tobramycin dan gentamicin (aminoglikosida) menembus koloni dengan lebih lambat, hal ini berkaitan dengan interaksinya dengan polimer ekstraseluler alginate. Selain menyulitkan penetrasi antibiotika, pembatasan oksigen dan aktivitas metabolik yang rendah pada biofilm juga menyebabkan resistensi antibiotika (Pace *et al.*, 2006).

#### **2.2.5.2 Pertumbuhan Sel yang Lambat**

Akibat minimnya nutrisi, sel-sel biofilm memiliki tingkat pertumbuhan yang lambat bila dibandingkan dengan sel fase stationer. Lebih lanjut lagi, sel bakteri pada biofilm terdiri dari populasi yang heterogen dengan variasi tingkat pertumbuhan di kompartemen biofilm yang berbeda, serta memiliki variasi sensitivitas terhadap antibiotika. Secara spesifik, bagian biofilm yang paling lambat pertumbuhannya adalah permukaan dalam yang jauh dari nutrisi dan oksigen. Pemeriksaan mikroskopis menunjukkan bahwa bakteri biofilm di bagian perifer terpengaruh oleh antibiotika sedangkan di bagian dalam sama sekali tidak

terpengaruh. Hal ini membuktikan bahwa pertumbuhan sel yang lambat mengurangi susceptibilitas terhadap antibiotika (Pace *et al.*, 2006).

### 2.2.5.3 Peningkatan Perpindahan Gen

Perpindahan gen (seperti transposon dan integron) atau mutasi kromosom dapat menyebabkan resistensi terhadap antibiotika. Perpindahan gen secara konjugasi memiliki peran penting dalam penyebaran resistensi antibiotika diantara berbagai spesies bakteri. Biofilm merupakan sebuah media yang tepat untuk pertukaran gen, hal ini berkaitan dengan lekatnya kontak dan stabilnya interaksi antara bakteri dalam biofilm. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa rasio konjugasi pada biofilm 1000 kali lebih besar daripada sekumpulan bakteri yang dihitung dengan teknik plating. Lebih lanjut lagi, rasio perpindahan gen pada biofilm lebih besar daripada suspensi bakteri planktonik (Pace *et al.*, 2006).

### 2.2.5.4 Ekspresi Gen Resisten

Penelitian genetik menunjukkan bahwa jumlah gen yang diekspresikan oleh biofilm lebih banyak daripada kultur sel planktonik. Namun gen-gen ini sebagian besar masih belum diketahui pasti fungsinya. Salah satu contoh ekspresi gen ditunjukkan oleh sel bakteri Gram negatif. Selama fase S, sel-sel bakteri Gram negatif mengeluarkan faktor resistensi berupa ekspresi gen-gen resisten, atau dikenal sebagai RpoS. Gen RpoS diduga dapat mengatur terjadinya *quorum sensing* atau interaksi antar sel yang berperan membentuk biofilm (Pace *et al.*, 2006).

### 2.2.5.5 Hipermutasi pada Biofilm

Kondisi lingkungan dan fisiologis seperti kurangnya nutrisi dan pengobatan antibiotika dapat meningkatkan rasio mutasi pada bakteri. Antibiotika



tidak hanya menyebabkan resistensi bakteri secara langsung, namun juga meningkatkan tingkat mutasi yang akibatnya adalah terjadinya *multi-drug resistance* (Pace *et al.*, 2006).

#### 2.2.5.6 Kondisi Multiseluler Biofilm

Sel-sel biofilm terdiri dari organisme multiseluler yang dapat berkomunikasi dengan sinyal transduksi untuk meregulasi ekspresi gen dan diferensiasi sel. Perilaku ini menyebabkan sel-sel biofilm dapat menggunakan nutrisi dan oksigen secara efisien, serta mampu melindungi diri terhadap sistem imunitas host dan antibiotika. Ketika ada serangan oleh antibiotika, maka bakteri yang berada di permukaan biofilm akan mendegradasi dan memodifikasi antibiotika agar sel-sel dibawahnya bisa tetap hidup. Bila terapi antibiotika dihentikan, maka akan ada populasi bakteri yang persisten yang kemudian tumbuh membentuk biofilm kembali (Pace *et al.*, 2006).

#### 2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm

##### 2.2.6.1 Metode Tabung

Metode tabung (*test tube / tube method*) merupakan salah satu tes pembentukan biofilm dengan penghitungan kualitatif dan semikuantitatif. Metode ini secara sederhana dapat memperkirakan ada atau tidak terbentuknya biofilm tercatat pada tabung berisi kultur bakteri. Pada dasarnya, koloni bakteri yang menempel pada suatu media mudah diwarnai dan diamati. Christensen *et al.* (2000) memperkenalkan metode tabung ini untuk mendemonstrasikan adanya produksi *slime* bakteri diantara staphylococci koagulase negatif yang diasosiasikan dengan infeksi kateter intravaskular. Karena metodenya sederhana, murah, dan mudah maka metode tabung sering digunakan peneliti terutama untuk mencari efek antimikroba terhadap biofilm.

Pada metode ini, *Staphylococcus* 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 (sebanyak 40 µL) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam dimasukkan ke tabung TSBglu (10 mL) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Lalu tabung di cuci 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 formasi biofilm nya. Tabung diperiksa dan jumlah formasi biofilm dinilai dengan penilaian secara subyektif. (Mathur, 2006).

#### 2.2.6.2 Metode Congo red Agar

Metode Congo red Agar merupakan metode alternatif lain untuk mendeteksi pembentukan biofilm oleh skrining isolat *Staphylococcus*, yang mengharuskan penggunaan solid khusus disiapkan media – *brain heart infusion broth* (BHI) dengan penambahan sukrosa 5% dan Congo red. Media ini terdiri dari BHI (37 gram / L), sukrosa (50 gram / L), agar no.1 (10 gram / L) dan congo red (0,8 gram / L). Congo red disiapkan sebagai larutan pekat dan diautoklaf pada 121 ° C selama 15 menit, terpisah dari media lain dan kemudian ditambahkan saat agar telah didinginkan sampai 55 ° C. Piring diinokulasi dan diinkubasi aerobik selama 24 sampai 48 jam pada suhu 37 ° C.

Hasil positif ditunjukkan oleh koloni hitam dengan konsistensi kristal kering. Produsen lendir lemah biasanya berwarna merah muda, meskipun sesekali gelap di pusat koloni dapat teramati. Koloni gelap dengan adanya morfologi kolonial kering kristal menunjukkan hasil yang tidak tentu. Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga dan diulang tiga kali (Mathur, 2006).



### 2.3 Biofilm *Staphylococcus aureus*

Bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri yang paling sering diisolasi. Salah satu alasan bakteri ini banyak terisolasi adalah karena *Staphylococcus aureus* dapat membentuk koloni pada nasofaring anterior sebanyak 10 – 40% pada manusia dan dapat dengan mudah berpindah ke kulit. Kolonisasi tersebut merupakan faktor predisposisi terjadinya infeksi. Jika trauma, prosedur medis, alat-alat perkutan, atau injeksi merusak barrier membran mukosa kulit maka koloni *Staphylococcus aureus* dapat menginvasi dan memproduksi penyakit klinis spektrum luas. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa pada 82% bakteremia *Staphylococcus aureus* berasal dari endogen (Jawetz *et al.*, 1996).

Pada komunitas, penyakit-penyakit yang berhubungan dengan *Staphylococcus aureus* adalah infeksi pada kulit, jaringan lunak, dan tulang. Di antara pasien-pasien di rumah sakit, infeksi *Staphylococcus aureus* adalah yang paling invasif dan termasuk di antaranya adalah nosokomial pneumonia, bakteremia, dan infeksi endovaskuler seperti endokarditis dan tromboflebitis sepsis, yang di mana dapat membentuk emboli pada organ-organ jauh. *Staphylococcus aureus* juga merupakan penyebab tersering infeksi pada peralatan medis dan implant, di mana peningkatan penggunaan peralatan medis sejak tahun 1980-an sampai 1990-an sangat berhubungan dengan peningkatan insiden bakteremia *Staphylococcus aureus* nosokomial (Satari, 2005).

Infeksi *Staphylococcus aureus* sulit untuk diatur, sering kali membutuhkan terapi antimikroba intravena selama berminggu-minggu. Infeksi yang serius, khususnya yang berhubungan dengan implan, membutuhkan operasi pengeluaran implan untuk menunjang kesembuhan. Jika tidak diterapi dengan serius, infeksi tersebut dapat kambuh dan berkembang menjadi masalah kronis yang membutuhkan supresi antimikroba yang lebih lama bahkan bisa

seumur hidup. Hal tersebut yang menyebabkan infeksi karena *Staphylococcus aureus* menghabiskan banyak biaya untuk penanganannya (Melnick *et al.*, 1996).

Sejak diketahui bahwa *Staphylococcus aureus* dapat membentuk biofilm pada jaringan, alat medis serta implan, hal ini menjadi tantangan baru dalam penanganan infeksi bakteri yang lebih serius lagi. Fakta menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* sangat virulen dan secara rutin memproduksi biofilm pada jaringan tubuh tanpa keberadaan material asing lain sehingga mendorong banyak peneliti untuk merancang strategi dalam penanggulangan biofilm tersebut (Pace *et al.*, 2006).

### 2.3.1 Patogenesis dan Fisiologi

Patogenesis biofilm pada semua mikroorganisme memiliki sedikitnya tiga tahapan. Tahap pengenalan dari patogenesis biofilm adalah adhesi dari mikroorganisme pada permukaan. Permukaan ini dapat berupa jaringan biologis atau materi inorganik. Tahapan kedua termasuk proliferasi sel pada permukaan dan produksi matriks eksopolisakarida yang memfasilitasi agregasi interseluler. Tahap ketiga sekaligus tahapan terakhir adalah pengorganisasian bakteri yang tertutup tersebut menjadi struktur tiga dimensi yang bentuknya seperti jamur yang diselingi oleh saluran di mana nutrisi dan hasil metabolisme dapat dialirkan. Sejak proses pembentukan biofilm dimulai dengan adhesi bakteri, diharapkan bahwa fisiologi dari bentuk adheren dan planktonik (non-adheren) dari *Staphylococcus aureus* berbeda. Para peneliti telah mempelajari bahwa *Staphylococcus aureus* pada tahap awal melekat pada permukaan silikon. Bakteri adheren tumbuh pada *half rate* bakteri pada kultur planktonik. *Staphylococcus aureus* pada fase eksponensial dari pertumbuhan biasanya menunjukkan peningkatan aktivitas respiratori. Hal yang perlu digarisbawahi di



sini adalah adanya bukti peningkatan signifikan pada resistensi antimikroba selama 2 jam adhesi dan meningkat lebih dari 7 hari (Jawetz *et al.*, 1996).

Dua aspek utama pada fenotipe biofilm adalah keterkaitannya pada penyakit. Keistimewaan pertama adalah peningkatan yang dramatis pada resistensi antimikroba. Untuk biofilm *Staphylococcus aureus*, konsentrasi minimum bakterisidal *in vitro* pada kebanyakan agen antimikroba rata-rata antara 2 sampai 1000 kali lebih tinggi daripada bentuk identik planktoniknya. Keistimewaan kedua adalah ketidakmampuan sel imun host untuk membunuh bakteri yang membentuk biofilm. Sebagai contoh, peneliti menunjukkan bahwa leukosit dapat mengikat dan penetrasi pada biofilm *Staphylococcus aureus*, tetapi tidak dapat memfagosit bakteri yang ada pada struktur biofilm tersebut. Keistimewaan tersebut menjelaskan mengapa terapi antimikroba tunggal untuk infeksi yang berkaitan dengan biofilm sering gagal. Operasi atau pemindahan implant yang sukses memberikan mekanisme bagaimana memindah bakteri secara mekanis (Satari, 2005).

Berdasarkan hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR), analisis perbedaan mikropresentasional, peneliti menemukan lima gen yang berpengaruh terhadap pertumbuhan biofilm. Tiga dari gen-gen tersebut masing-masing mengkode sebuah enzim jalur glikolisis atau fermentasi, di mana dapat merefleksikan penurunan ketersediaan oksigen. Dua gen yang lain mengkode enzim yang dapat membantu *Staphylococcus aureus* beradaptasi pada keterbatasan nutrisi, utamanya threonine, dan stress protein general yang homolog pada *Pseudomonas fluorescens* biofilm. Gen-gen tersebut seluruhnya tampak membantu bakteri biofilm untuk beradaptasi pada permukaan adheren (Pace *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Molekul yang Berkontribusi pada Adhesi *Staphylococcus aureus*

Adhesi bakteri pada permukaan, di mana merupakan tahap awal dari patogenesis biofilm, ditentukan dari kombinasi dari interaksi antara permukaan bakteri, permukaan substrat, dan lingkungan sekitarnya. Zat-zat kimia pada permukaan bakteri dan substrat menentukan interaksi non-spesifik seperti interaksi ionik, hidrofobik, dan van der Waals yang berakibat pada atraksi dan repulsi. Molekul-molekul pada kedua permukaan juga dapat berpartisipasi pada interaksi reseptor ligand spesifik yang memacu adhesi. Pada akhirnya, faktor-faktor lain seperti aliran hidrodinamik, kondisi nutrisi, tekanan oksigen, dan pH berkontribusi pada seluruh proses (Satari, 2005).

Perubahan dramatis pada permukaan bakteri juga dapat mempengaruhi adhesi ke permukaan. Asam teikoat adalah polimer anionik yang terdistribusi secara seragam pada seluruh dinding peptidoglikan *Staphylococcus aureus*, berkontribusi pada *negative charge* dalam jumlah besar pada permukaan bakteri. Mereka mengandung banyak bagian yang dapat diglikosilasi atau diesterifikasi oleh asam amino dengan D-alanin. Peneliti menemukan bahwa dihilangkannya D-alanin ester pada asam teikoat *Staphylococcus aureus* menyebabkan penurunan yang signifikan pada perlekatan awal dan kemampuannya untuk membentuk biofilm pada *polystyrene* dan kaca, yang merupakan permukaan yang hidrofobik dan hidrofilik. Mutasi tersebut berasal dari gangguan pada *dltABCD* operon yang responsif untuk penggabungan D-alanin pada asam teikoat. Dapat dispekulasikan bahwa kekurangan D-alanin esterifikasi mengurangi interaksi atraktif hidrofobik antara mutasi *dltA* dan *polystyrene*. Namun mutasi tersebut tidak mempengaruhi produksi eksopolisakarida yang penting untuk fase agregasi pada perkembangan biofilm (Pace *et al.*, 2006).

Bagian dinding sel lain yang mempengaruhi perlekatan primer terhadap *polystyrene* adalah autolisin. Protein ini merupakan peptidoglikan hidrolase,



enzim yang memotong peptida atau setengah glikan pada dinding sel, lalu berpartisipasi dalam melisis sel dan pembelahan. Autolisin awalnya diidentifikasi sebagai kontributor yang penting terhadap perkembangan biofilm pada *Staphylococcus epidermidis*, di mana gangguan pada gen autolisin *atlE* oleh insersi transposon secara signifikan mengurangi inisial adhesi bakteri pada *polystyrene*. Strain *atlE*-negative mengurangi hidrofobisitas dari permukaan sel dan membentuk agregat yang luas sejak pemisahan sel. Gen homolog *atl* pada *Staphylococcus aureus* juga mengkode autolisin dan mutagenesis prosedur *atl* bakteri pada cluster yang luas seperti yang terlihat dengan mutagenesis dari *atlE* pada *Staphylococcus epidermidis* (Higashi dan Paul, 2006).

Adhesi bakteri pada permukaan polimer seperti *polystyrene* dapat dikaitkan pada beberapa situasi klinis. Bakteri dapat melekat ke polimer pada periode intermediet sebelum penempatan alat medis atau implan ke pasien. Sebagai tambahan, bakteri juga dapat melekat pada bagian perkutan pada bagian luar alat tersebut. Ketika alat medis atau implan dipasang pada pasien, protein dan sel meresap ke permukaannya dalam beberapa detik. Pada tahap ini, bakteri akan lebih berinteraksi dengan permukaan yang termodifikasi pada *host* dibandingkan dengan alat medis itu sendiri. Walaupun interaksi fisik-kimia masih merupakan kontribusi yang penting untuk terjadinya proses adhesi, tetapi keberadaan protein dan sel memberikan kemungkinan interaksi ligan-reseptor yang spesifik (Pace *et al.*, 2006).

Protein permukaan *Staphylococcus aureus* yang berpartisipasi dalam interaksi spesifik dapat mengenali matriks ekstraseluler dan protein plasma. Protein matriks ekstraseluler banyak terdapat pada luka, tulang, endothelium yang rusak, implan ortopedi dan implan pada jaringan lunak. Protein plasma ditemukan tidak hanya dalam darah tetapi juga terikat dalam bekuan darah, permukaan alat medis, dan implan yang kontak dengan darah. Protein tersebut

sangat banyak dan tersebar pada organisme hidup, memberikan banyak tempat bagi *Staphylococcus aureus* untuk menimbulkan infeksi (Jawetz *et al.*, 1996).

### 2.3.3 Faktor Molekuler yang Berkontribusi pada Agregasi Interseluler dan Produksi Eksopolisakarida

#### 2.3.3.1 *Polysaccharide Intercellular Adhesin/Polymeric N-Acetyl Glucosamine*

*Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) atau *Polymeric N-Acetyl Glucosamine* (PNAG) adalah nama resmi dari *slime*, yaitu matriks eksopolisakarida yang diproduksi oleh *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus* yang memediasi akumulasi seluler menjadi *cluster multilayer* pada tahap kedua perkembangan biofilm (Pace *et al.*, 2006).

Gen-gen yang responsif terhadap ekspresi PNAG pertama kali diidentifikasi pada *Staphylococcus epidermidis* melalui pembangkitan mutasi yang dapat melekat pada permukaan, tetapi tidak dapat membentuk cluster multiseluler dan tidak memproduksi PNAG. Mutasi yang memproduksi fenotipe biofilm negative adalah bagian dari *intercellular adhesion (ica)* operon. *Ica operon* terdiri dari *icaR* (*regulatory gene*) dan *icaADBC* (*biosintesis polisakarida gene*). Peneliti telah meneliti bahwa *Staphylococcus aureus* dan beberapa spesies *Staphylococcus* lainnya juga mengandung *ica locus*. Transkripsi *ica locus* pada *Staphylococcus aureus* tidak konstitutif, dan banyak strain yang memiliki *ica locus* tidak membentuk biofilm. Namun pada *Staphylococcus aureus* yang membentuk biofilm, penghilangan *ica locus* dapat menghilangkan kemampuan membentuk biofilm dan membuat PNAG (Higashi dan Paul, 2006).



### 2.3.3.2 *Alpha-Toxin*

Molekul lain yang juga mempengaruhi adhesi interseluler dan agregasi pada *Staphylococcus aureus* adalah *alpha-toxin*. *Alpha-toxin* yang dikode oleh gen *hla* adalah toksin sekresi dan mutimerik. *Alpha-toxin* dapat melisis sel host dengan berkumpul menjadi heptamer yang berfungsi sebagai pori pada membran sel eukariotik. Secara *in vitro*, mutasi *hla* menghasilkan strain yang tidak membentuk biofilm. Strain tersebut dapat menempel ke permukaan, tetapi tidak membentuk *multilayer cluster* yang dibutuhkan pada tahapan kedua pembentukan biofilm. Dengan dilengkapinya gen *hla* menjadi strain dengan mutasi *hla* menyebabkan hipersekresi dari *alpha-toxin* dan mengembalikan kemampuan untuk membentuk biofilm. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa *alpha-toxin* dapat berperan pada tahap awal infeksi yang terkait dengan biofilm (Pace *et al.*, 2006).

### 2.3.3.3 *Biofilm Associated Protein*

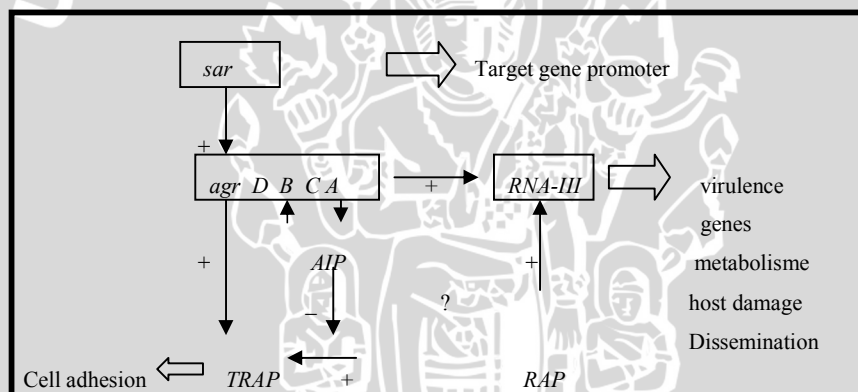
*Biofilm associated protein* (Bap) merupakan protein permukaan yang pertama kali diidentifikasi pada *bovine mastitis Staphylococcus aureus* isolat V329, mempengaruhi tahap pertama dan kedua pembentukan biofilm *in vitro*. Mutasi pada Bap menurunkan hidrofobisitas permukaan bakteri relatif terhadap strainnya, memberikan pengertian bahwa Bap memicu pelekatan pada *polystyrene* via interaksi hidrofobik non-spesifik. (Pace *et al.*, 2006).

### 2.3.4 *Quorum sensing Staphylococcus aureus*

*Quorum sensing* adalah komunikasi sel satu dengan sel lainnya melalui sinyal ekstraseluler yang dihasilkan bakteri saat densitas sel tinggi. *Quorum sensing* sistem menunjukkan cara mengatur dan mengkoordinasi ekspresi faktor-

faktor virulensi pada sejumlah organisme dan berimplikasi pada formasi, pembentukan, perbedaan, dan maturasi biofilm (Pace *et al.*, 2006).

Bakteri Gram positif meregulasi berbagai proses selulernya melalui *peptide-mediated quorum sensing*. Protein yang mendorong terjadinya adhesi dan kolonisasi diekspresikan pada awal fase pembelahan. Ketika pertumbuhan sel mencapai densitas yang tinggi, protein melakukan kerusakan pada host, predominasi metabolisme dan disseminasi. Sebagian besar kejadian tersebut dibawah kontrol *accessory gene regulator(agr)* dan *staphylococcal gene regulator (sar)*. *Agr* diaktivasi selama transisi dari fase pembelahan menjadi fase perkembangan. Ekspresi *agr* ini menunjukkan korelasi negatif terhadap kemampuan adhesi ke *polystyrene* dan pembentukan biofilm. Oleh karena itu, *agr* tidak esensial untuk pembentukan biofilm (Pace *et al.*, 2006).



Gambar 2.9 Quorum Sensing *Staphylococcus aureus* (Fox, 2003)

Pada Gambar 2.9 terlihat interaksi yang kompleks antara *agr*, *sar*, dan sistem TRAP. *AIP* (*auto-inducing peptide*) dibuat dari precusornya (*agrD*) dan disekresi melalui kerja protein membran *agrB*. Peptida tersebut kemudian berinteraksi dengan *agrAC two-component system*. Sinyal transduksi menghasilkan produksi molekul efektor *RNA-III*, yang memodulasi faktor virulensi pada level transkripsi dan posttranskripsi. Aktivasi *RNA-III* bergantung pada waktu dan densitas sel. *RNA-III* menurunkan perlekatan *Staphylococcus aureus*



ke fibrinogen dalam kondisi statis, dan meningkatkan perlekatan ke fibronektin dansel epitel baik pada kondisi statis maupun mengalir. Protein pengkode *sar* berikatan dengan promoter *agr* untuk menstimulasi transkripsi *RNA-III*, selain itu juga berinteraksi langsung dengan promoter gen target untuk mengatur ekspresi gen. Baik aktivasi maupun inaktivasi *sarA* menghambat terjadinya perlekatan bakteri. Dapat disimpulkan mutasi *sarA* diketahui menurunkan kapasitas pembentukan biofilm (Fox, 2003).

*RNA-III-activating peptide (RAP)* menjadi sistem regulasi ketiga. Fosforilase protein target *RAP (TRAP)* menstimulasi transkripsi *agr* dan sekaligus mendorong peningkatan adhesisel dan berhubungan dengan formasi biofilm. AIP menghambat fosforilase TRAP (Fox, 2003).

## 2.4 Sirih Merah (*Piper crocatum*)

### 2.4.1 Taksonomi

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae (suku sirih-sirihan)
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper crocatum</i> (Dasuki,1994)

#### 2.4.2 Ciri Fisik Sirih Merah (*Piper crocatum*)



**Gambar 2.10** Tanaman Sirih Merah (Sholikhah, 2006).

Sirih merah termasuk tumbuhan menjalar. Batangnya bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing bertepi rata dan permukaan mengkilap atau tidak berbulu. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak putih keabu-abuan. Bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlendir, berasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih. Batangnya berjalur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Tinggi tanaman biasanya mencapai 10 m, tergantung pertumbuhan dan tempat merambatnya (Sudewo,2005).

#### 2.4.3 Habitat Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Tanaman sirih merah di Indonesia banyak terdapat di daerah Bandung dan Yogyakarta. Pembibitan dan perbanyakan sirih merah dilakukan secara vegetatif dengan stek, cangkok, dan runduk batang. Tanaman sirih merah dapat beradaptasi dengan baik di setiap jenis tanah sehingga mudah dikembangkan dalam skala besar. Tanaman ini akan tumbuh dengan baik jika mendapat 60 – 75% cahaya matahari (Sudewo,2005).



#### 2.4.4 Khasiat Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Tanaman sirih merah dapat dimanfaatkan sebagai obat, baik untuk obat luar ataupun obat yang diminum. Ramuan sirih merah yang digunakan untuk obat biasanya berupa sirih merah yang diramu secara tunggal maupun dicampur dengan tanaman obat lainnya untuk mendapatkan khasiat yang maksimal. Kandungan kimia senyawa aktif yang terdapat pada daun sirih merah adalah polifenolad dan tannin. Kedua senyawa tersebut termasuk golongan fenol dan aktivitas biologis sebagai penangkal radikal bebas sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat melawan penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas seperti kanker (Hernani,2004).

Disamping sebagai antioksidan, sirih merah juga bersifat sebagai antiseptik artinya ia mampu mengeliminasi pertumbuhan mikroorganisme pada kulit. Misal jamur *Candida albicans* penyebab sariawan pada mulut dan gatal-gatal pada alat kelamin. Golongan senyawa yang memiliki sifat sebagai antiseptik pada daun sirih merah yaitu alkaloid, saponin, flavonoid, minyak atsiri dan tannin (Cahyana,2006).

Zat aktif yang terkandung diseluruh bagian tanaman dapat merangsang saraf pusat, daya pikir, meningkatkan peristaltik, merangsang kejang dan meredakan sifat dengkur. Sirih merah biasanya dimanfaatkan untuk mengobati berbagai macam penyakit, seperti kencing manis, jantung koroner, kanker rahim, kanker payudara, ambeien, TBC, obat eksim, obat sakit gigi, sariawan, keputihan akut, bau badan, penyakit kelamin, dan masih banyak lagi (Syariefa,2006).

#### 2.4.5 Kandungan Kimia Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun sirih merah yakni alkaloid, saponin, tannin, dan flavonoid (Sholikhah,2006). Sedangkan dari hasil kromatogram dapat dilihat bahwa daun sirih merah mengandung flavonoid, polifenolad, tannin, dan minyak atsiri (Sudewo,2005).

Minyak atsiri, atau dikenal juga dengan minyak eteris (*aetheric oil*), minyak esensial, minyak terbang, serta minyak aromatik, adalah kelompok besar minyak nabati yang berwujud cairan kental pada suhu ruangan namun mudah menguap sehingga memberikan aroma yang khas. Minyak atsiri daun sirih merah diketahui mengandung safrole (48,69%), eugenol (11,73%), Allylpyro catechol diacetate (11,34%), dan phenol (12,55%) (Arambewela *et al.*,2005). Melalui pengolahan dapat ditemukan phenol (chavibetol; 3-hydroxy-4-methoxyallylbenzene), dan terdapat juga kandungan cavichol (p-allyl-phenol; 4-allyl-phenol), estragole (p-allyl-anisole; 4-methoxyallylbenzene), eugenol (allylguaiacol; 4-hydroxy-3-methoxy-allylbenzene; 2-methoxy-4-allyl-phenol), methyl eugenol (eugenol methyl eter; 3,4-dymethoxy-allylbenzene), dan hydroxycatechol (2,4-dyhydroxy-allylbenzene) (Nationmaster,2008).

Daun sirih merah mengandung flavonoid yang memiliki kemampuan untuk berkaitan dengan sel mikroba. Ia dapat berkaitan dengan asam amino yang dapat menginaktivasi suatu protein mikroba sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya. Flavonoid juga memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks dengan komponen ekstraseluler terlarut dan dengan dinding sel (Cowan,1999; Naim,2004). Sebuah penelitian menunjukkan bahwa flavonoid memiliki kemampuan menghambat senyawa adhesin (Crespo *et al.*, 2008). Padahal adhesin merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi pembentukan biofilm disamping eksopolisakarida (EPS). Adhesin berperan pada perlekatan sel bakteri di permukaan substrat (Jass *et all.*,2003).



Beberapa tulisan ilmiah juga menyebutkan, daun sirih merah mengandung enzim diastase, gula, dan tannin. Namun, daun muda mengandung diastase, gula, dan minyak atsiri lebih banyak ketimbang yang tua, sedangkan tannin relatif sama. Sama seperti flavonoid, tannin mampu menginaktivasi adhesin, enzim, dan protein transport pada dinding sel kuman di samping melakukan perusakan substrat (DEOSC,2007).

Senyawa polifenol pada daun sirih merah seperti asam galiat terbukti mampu menghambat biofilm dengan cara menurunkan pertumbuhan sel bakteri pada dosis tinggi, dan menurunkan interaksi antar sel atau *quorum sensing* pada dosis yang lebih rendah (Huber *et al.*, 2003). Selain itu senyawa polifenol secara umum dapat merusak substrat dan menghambat enzim sehingga bakteri tidak dapat tumbuh (Naim, 2004).

