

## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

**2.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif berbentuk bulat atau kokus yang hidup secara individu maupun bergerombol (Tolan, 2012). Normalnya, bakteri ini tidak berbahaya dan merupakan flora normal di saluran nafas, kulit, dan membran mukosa pada manusia. Bahkan, sebagian bakteri *Staphylococcus* merupakan komponen mikroba dari flora tanah (Madigan *et al.*, 2006). Meskipun *S. aureus* tidak selalu patogenik, bakteri ini merupakan penyebab paling umum infeksi kulit, penyakit pernafasan, dan keracunan makanan (Mitchell *et al.*, 2012).

**2.1.1 Taksonomi**

*Staphylococcus* adalah genus dari bakteri Gram positif. Genus *Staphylococcus* terdiri dari 40 spesies (Harris *et al.*, 2002). Berikut adalah taksonomi dari bakteri *S. aureus*.

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Bacillales

Family : Staphylococcaceae

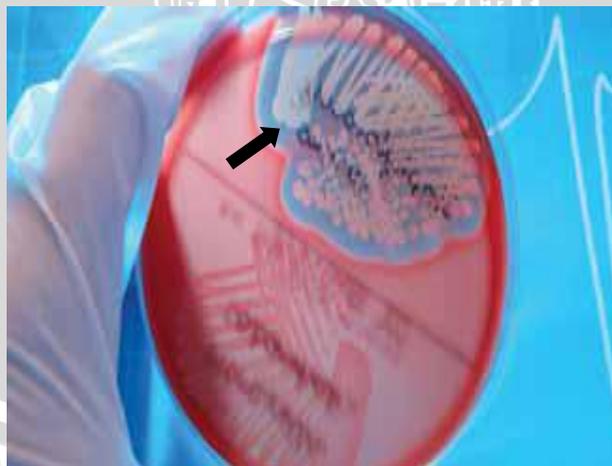
Genus : *Staphylococcus*

Species : *Staphylococcus aureus* (de Vos *et al.*, 2009).

## 2.1.2 Karakteristik Bakteri

### 2.1.2.1 Ciri Organisme

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif berbentuk kokus seperti anggur dan membentuk sel bulat atau oval berdiameter sekitar 1  $\mu\text{m}$  dan cenderung menggerombol. *S. aureus* adalah bakteri dengan hasil tes koagulase positif, oksidase negatif, katalase positif, fakultatif anaerob, tetapi tumbuh paling baik pada kondisi aerob, dan sifatnya nonmotil. Suhu optimal untuk tumbuhnya antara 35-40 derajat Celcius. Stabilitas termal selnya bervariasi tergantung dimana mereka tumbuh (Adams and Moss, 2008). Bakteri ini tidak berspora, tidak bergerak, dan tidak berkapsul. Koloni dari bakteri ini berwarna hitam pada medium *Congo Red Agar*, kuning pada medium *tripticase soy agar*, dan jingga pada *Chrom Agar* khusus *S. aureus* (Kayser *et al.*, 2005). *S. aureus* adalah organisme halotoleran, yang berarti bisa bertahan dan memproduksi enterotoksin pada lingkungan garam, misalnya pada NaCl 20% (Jaj *et al.*, 2005).



Gambar 2.1 Tanda Panah Hitam Menunjukkan Daerah yang Lebih Jernih yang Ditimbulkan *Staphylococcus aureus* pada Media *Blood Agar Plate* (Siegrist, 2011)

### 2.1.2.2 Biakan

*S. aureus* membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Pada media *Nutrient agar* setelah dilakukan inkubasi aerob atau mikroaerofilik pada suhu 37°C selama 24 jam didapatkan bentuk koloni dengan diameter 2-3 mm dengan permukaan koloni yang halus, bentuk bulat, menonjol, dan berkilau. *S. aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu hingga kuning emas tua (Kayser *et al.*, 2005). *S. aureus* juga menghasilkan berbagai tingkatan hemolisis seperti alfa, beta, dan gamma. *S. aureus* juga dapat dibiakkan pada *blood agar*. Pada galur yang ganas dapat terlihat zona hemolisis yang jernih di sekitar koloni (Gambar 2.1). Bakteri ini dapat memfermentasikan manitol. *Mannitol salt agar* digunakan untuk mendeteksi *S. aureus* yang berasal dari feses, makanan, debu, dan pakaian. Pada media cair didapatkan gambaran kekeruhan yang seragam dengan terdapat endapan seperti bubuk pada dasar tabung (Brooks *et al.*, 2007)

### 2.1.2.3 Sifat Pertumbuhan

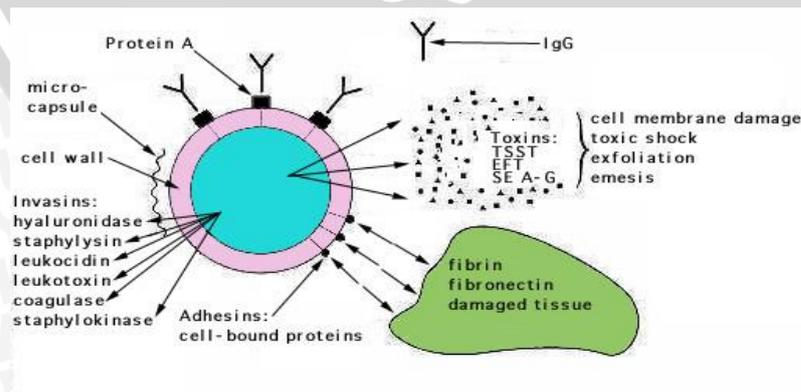
Bakteri ini meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat, tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi untuk setiap galur. *S. aureus* relatif resisten terhadap lingkungan kering dan panas (bisa tahan terhadap suhu 50°C selama 30 menit), serta terhadap natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh zat-zat kimia tertentu seperti heksaklorofen 3% (Jawetz *et al.*, 1996).

### 2.1.3 Struktur Antigen

*S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik yang merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel. Kerangka luarnya yang kaku pada dinding sel terbentuk dari berlapis-lapis peptidoglikan, suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit terangkai. Asam

teikoat, yang merupakan polimer gliserol atau ribitol fosfat, berikatan dengan peptidoglikan dan bersifat antigenik, berfungsi sebagai regulator sirkulasi keluar masuknya kation pada sel serta mencegah rusaknya dinding sel saat pertumbuhan sel (Midlandstech, 2011; Melnick *et al.*, 1996).

Protein A merupakan komponen dinding sel dari hampir semua galur *S. aureus*. Ia terikat pada bagian Fc molekul IgG selain IgG3. Bagian Fab pada IgG yang terikat pada protein A bebas berikatan dengan antigen spesifik. Beberapa galur *S. aureus* dapat menghambat fagositosis oleh limfosit polimorfonuklear, kecuali kalau ada antibodi spesifik. Kebanyakan *S. aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal pada permukaan di dinding sel. Koagulase berikatan secara non enzimatik dengan fibrinogen sehingga bakteri beragregasi (Jawetz *et al.*, 1996; Melnick *et al.*, 1996). Di bagian dalam dari dinding sel terdapat membran plasma yang keduanya dipisahkan oleh ruang periplasmik. *Penicillin binding proteins* (PBPs) merupakan protein pada membran sel yang berfungsi untuk membangun lapisan peptidoglikan (Katzung *et al.*, 2011). Protein pada dinding sel yang lain adalah *clumping factor*, *fibronectin-binding protein*, dan *collagen-binding protein* yang berperan dalam proses adhesi pada jaringan (Kayser *et al.*, 2005). Struktur antigen *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Struktur Antigen *Staphylococcus aureus* (Todar, 2009)

#### 2.1.4 Enzim dan Toksin

*S. aureus* mampu memproduksi berbagai macam toksin dan enzim untuk menciptakan lingkungan hidup yang optimal. Hampir semua toksin dan enzim ini berdampak buruk bagi manusia. Enzim dan toksin tersebut adalah:

- a. Katalase: enzim yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen sehingga kelangsungan hidup bakteri terjaga. Tes katalase berguna untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus* (Jawetz *et al.*, 1996).
- b. Koagulase: enzim yang berfungsi mirip dengan *thrombin* untuk mengubah *fibrinogen* menjadi *fibrin*. Dengan adanya *fibrin* yang menyelubungi bakteri akan mengganggu proses fagositosis dan bakteri akan lebih invasif (Jawetz *et al.*, 1996).
- c. *α-Toxin*: eksotoksin yang mempunyai efek mematikan untuk sistem saraf pusat, merusak membran sehingga dapat menyebabkan hemolisis, dan dapat menyebabkan nekrosis pada kulit (Mitchell *et al.*, 2012).
- d. Leukosidin: toksin ini bersifat mematikan sel darah putih. Merusak mikrofag dan makrofag dengan mekanisme degranulasi (Gordon and Lowy, 2008).
- e. Eksofoliatin: mengakibatkan lisis epidermis sehingga terjadi deskuamasi pada sindrom lepuh kulit. Toksin ini mengencerkan matriks mukopolisakarida pada epidermis (Wu *et al.*, 2003).
- f. Enterotoksin: enterotoksin jenis (A-E, H, G, I) dapat menimbulkan sindrom keracunan makanan. Enterotoksin ini tahan panas (tahan pendidihan selama 30 menit) dan tahan terhadap daya kerja enzim-enzim usus. Enterotoksin ini resisten terhadap enzim proteolitik seperti pepsin, tripsin, kemotripsin, renin, dan, papain. Enterotoksin ini dihasilkan ketika bakteri tumbuh pada makanan

yang mengandung karbohidrat dan protein (Brooks *et al.*, 2005; Kayser *et al.*, 2005).

g. *Toxic Shock Syndrome Toxin-1* (TSST-1): diproduksi oleh sekitar 1% galur *Staphylococcus*. TSST-1 merupakan superantigen yang memicu mitosis dari limfosit T sehingga terjadi produksi sitokin yang masif yang akhirnya memunculkan gejala syok toksik seperti demam dan ruam. (Brooks *et al.*, 2005; Kayser *et al.*, 2005).

h. *Protease*: Enzim ini bersifat proteolitik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang mengalami invasi, misalnya jaringan tulang (Arrecubieta *et al.*, 2006).

### 2.1.5 Patogenesis dan Manifestasi Klinis

*S. aureus* paling banyak berada di dalam nares, tetapi juga dapat ditemukan pada kulit termasuk aksila dan daerah inguinal, saluran gastrointestinal, saluran pernafasan serta area perianal (Werthein *et al.*, 2005). Bakteri ini menjadi bakteri oportunistik yang menginfeksi jaringan dengan sistem imun yang rendah, seperti kulit yang mengalami kerusakan. *S. aureus* memiliki toksin dan enzim yang membantunya bertahan hidup di lingkungan tertentu (Kayser *et al.*, 2005). *S. aureus* yang patogen dan invasif cenderung menghasilkan koagulase dan pigmen kuning serta bersifat hemolitik. Pada tipe infeksi invasif, untuk tetap berada di tempat setelah penetrasi ke dermis dan mukosa akan tampak karakteristik purulen, seperti furunkel, karbunkel, infeksi luka, dan sinusitis. Invasi *S. aureus* pada folikel rambut dan kelenjar lemak bersama enzim dan toksinnya yang melawan reaksi sistem imun dan fagositosis dapat menimbulkan lesi. Bahkan setelah fagositosis, destruksi intraseluler yang difasilitasi oleh komplemen berlangsung tidak sempurna. Resistensi ini dapat

menyebabkan infeksi yang kronis (Melnick *et al.*, 1996). Keracunan makanan karena enterotoksin *S. aureus* akan menimbulkan gejala seperti mual, muntah, dan diare berat. Terdapat pula tipe infeksi campuran seperti pada *Ritter disease*, *pemphigus neonatorum*, dan *bullous impetigo*. Penyakit-penyakit ini disebabkan oleh *S. aureus* yang memproduksi eksofoliatin yang menginfeksi permukaan kulit dan menghasilkan TSST-1 yang menyebabkan sindrom syok toksik. Gejalanya berupa hipotensi, demam, dan ruam (Kayser *et al.*, 2005). *S. aureus* memiliki banyak protein permukaan yang disebut *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM) yang berperan sebagai mediator penempelan bakteri pada jaringan. MSCRAMM mengikat molekul seperti kolagen, fibronektin, dan fibrinogen. MSCRAMM yang berbeda bisa menempel pada komponen jaringan inang yang sama. MSCRAMM berperan dalam inisiasi infeksi endovaskuler, tulang, sendi, dan infeksi dari alat prostetik (Menzies, 2003).

## 2.1.6 Diagnosis Laboratorium

### 2.1.6.1 Biakan

Kultur dengan media *Blood Agar Plate* akan menghasilkan koloni khas dalam 18 jam pada suhu 37°C. Hemolisis dan pembentukan pigmen dapat terlihat secara optimal pada suhu kamar. Bahan yang terkontaminasi flora campuran dapat ditanam dalam perbenihan yang mengandung NaCl 7,5% karena garam akan menghambat pertumbuhan kebanyakan flora selain *S. aureus* (Melnick *et al.*, 1996). Untuk membedakan *S. aureus* dengan spesies lain, dapat juga dilakukan inkubasi pada *Chrom Agar*. Koloni bakteri *S. aureus* akan menghasilkan warna merah muda (*Chromagar*<sup>TM</sup>, 2009).

### 2.1.6.2 Tes Katalase

Katalase adalah enzim yang dimiliki oleh hampir semua makhluk hidup yang mengonsumsi oksigen. Enzim ini sangat penting untuk mencegah sel dari radikal bebas yang disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan mengurai hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air (Chelikani *et al.*, 2004). Keberadaannya pada bakteri dapat dideteksi dengan menambahkan hidrogen peroksida ke bakteri. Jika terbentuk gelembung yang merupakan oksigen, maka hasilnya disebut katalase positif. Tes ini biasa digunakan untuk mengetahui jenis bakteri. *Staphylococci*, *Listeria*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus*, dan *Cryptococcus* adalah contoh bakteri katalase positif. Sedangkan contoh bakteri katalase negatif adalah *Streptococcus* dan *Enterococcus spp.* (Brooks *et al.*, 2007).

### 2.1.6.3 Tes Koagulase

Koagulase adalah enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme dan dapat bereaksi dengan protrombin darah untuk menghasilkan *staphylothrombin*, zat yang membantu enzim protease mengubah fibrinogen menjadi fibrin sehingga menimbulkan penggumpalan darah. Hasil tes koagulase disebut positif jika ditemukan gumpalan makroskopik dalam plasma yang telah ditambahkan pada bakteri setelah 10 detik. Kepentingan dari tes ini adalah untuk membedakan antara *Staphylococcus* koagulase positif dan *Staphylococcus* koagulase negatif. Contoh bakteri koagulase positif adalah *S. aureus* dan *S. intermedius*. Sedangkan bakteri koagulase negatif contohnya adalah *S. saprophyticus*, *S. capitis*, dan *S. epidermidis*. *S. aureus* memproduksi dua jenis koagulase, yaitu koagulase terikat atau "*clumping factor*" dan koagulase bebas. Koagulase berada di permukaan bakteri *S. aureus* dan dapat menyebabkan bakteri diselubungi oleh

fibrin saat mengalami kontak dengan darah, sehingga bakteri resisten terhadap fagositosis. Semua *Staphylococcus* yang bersifat koagulase positif dianggap patogen bagi manusia (Jawetz *et al.*, 1996).

#### 2.1.6.4 Tes Kepekaan Antibiotik

Tes kepekaan antibiotik dengan metode dilusi medium atau difusi agar *plate* sebaiknya dilakukan secara rutin pada isolat *Staphylococcus* dari klinik. Resistensi terhadap penisilin G dapat diperkirakan dengan tes  $\beta$ -lactamase positif. Sekitar 90% *S. aureus* akan menghasilkan  $\beta$ -lactamase (Jawetz *et al.*, 1996).

#### 2.1.6.5 Tes Serologis dan Penentuan Tipe

Antibodi terhadap asam teikoat dapat dideteksi pada infeksi *S. aureus* yang kronis (Jawetz, 1996). Pola kepekaan antibiotika dapat membantu identifikasi infeksi *S. aureus* dan menentukan apakah isolat bakteri dari biakan darah mewakili bakteremia disebabkan jenis yang sama dan berasal dari satu tempat infeksi (Melnick *et al.*, 1996). Penentuan tipe ini hanya dipakai untuk melacak infeksi dalam penelitian epidemiologi pada wabah infeksi *S. aureus* yang luas, yang dapat terjadi di rumah sakit (Jawetz *et al.*, 1996).

#### 2.1.7 Epidemiologi

Lebih dari 100 tahun *S. aureus* dikenal sebagai patogen penting dan penyebab infeksi nosokomial yang paling sering yang telah menyebabkan lebih dari 70,000 kematian per tahun di Amerika Serikat (Lowy, 2003; Furuya and Lowy, 2006). *S. aureus* merupakan bakteri patogen yang paling sering diisolasi dari manusia dan merupakan penyebab infeksi kulit, jaringan lunak, infeksi endovaskular, pneumonia, endokarditis, osteomyelitis, dan sepsis (David and

Daum, 2010). *Multidrug-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) menyebar secara global. Salah satu contohnya adalah MRSA dari Brazil yang menyebar ke Portugal, Argentina, dan Republik Ceko (Oliveira *et al.*, 2002). Bahkan setelah munculnya MRSA tahun 1961, menurut *National Nosocomial Infection Surveillance System* di Amerika Serikat, infeksi *S. aureus* selalu meningkat dari 2,4% pada tahun 1974, 5% pada tahun 1981, 29% pada tahun 1991, 43% pada tahun 1997 (Gardam, 2000). Angka kejadian infeksi nosokomial akibat *S.aureus* juga meningkat mencapai angka 19,4% pada tahun 1985-1988 (Horan *et al.*, 1988). Jumlah ini terus meningkat mencapai angka rata-rata 44,3% (rentang 25,7-58,3%) dari kejadian bakteremia di Botswana sepanjang tahun 2000-2007 yang disebabkan oleh *S. aureus* (Wood M. *et al.*, 2009). Pada pasien bakteremia *S. aureus*, mortalitas pasien nonkarier lebih tinggi dari karier, karena pada karier infeksi berasal dari koloni yang sudah ada sehingga imunitas sudah berkembang (Wertheim *et al.*, 2004).

Menurut *National Institutes of Health*, lebih dari 60% dari keseluruhan infeksi mikroba disebabkan biofilm (Costerton *et al.*, 2003). Biofilm *S. aureus* sering menyebabkan infeksi kronis pada pasien dengan alat medis implan, seperti 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 sampel urin pasien dengan infeksi akibat kateter urin diteliti, ditemukan bahwa 83,3% merupakan *S.aureus* penghasil biofilm (Gad *et al.*, 2009). Biofilm juga meningkatkan resiko infeksi rekuren serta penyebaran emboli infeksi (Sutherland, 2001). Dalam studi klinis pada 66 luka dengan berbagai macam etiologi, 60%

luka kronis mengandung biofilm, dibandingkan dengan 6% pada luka akut, menunjukkan kemungkinan peran biofilm dalam membuat luka sulit sembuh dan menjadi kronis. Penelitian juga menunjukkan adanya berbagai spesies di luka kronis itu dalam bentuk biofilm (James *et al.*, 2008).

### 2.1.8 Transmisi dan Kontrol

Kebersihan 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.*, 1996). Daerah yang paling rawan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* di rumah sakit adalah ruang perawatan bayi, unit perawatan intensif, ruang bedah, dan bagian kemoterapi. *S. aureus* patogen banyak sekali masuk ke daerah ini dan dapat menyebabkan infeksi nosokomial yang berbahaya. Karyawan dan pengunjung dengan lesi *S. aureus* yang aktif dan karier harus diperingatkan agar tidak memasuki kawasan ini. Pada orang-orang ini, pemakaian antiseptik topikal misalnya di hidung dapat mengurangi penyebaran bakteri. Obat anti *Staphylococcus* oral kadang dapat menekan keadaan karier dalam jangka panjang dan mungkin dapat menyembuhkannya, tetapi tidak direkomendasikan. 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 (Melnick *et al.*, 1996).

## 2.2 Biofilm

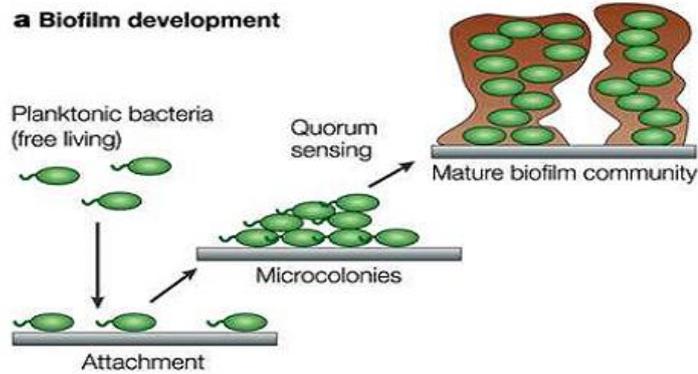
### 2.2.1 Definisi

Biofilm adalah sekumpulan sel hidup yang membentuk mikrokoloni dan melekat pada suatu permukaan serta dilindungi *glycocalyx*, matriks ekstraselular polimerik yang diproduksi sendiri oleh organisme pembentuk biofilm atau disebut

juga *extracellular polymeric substance* (EPS). Sebagian besar volume biofilm berisi EPS ini, bukan sel. EPS tersusun atas polisakarida, protein, lipid, dan DNA ekstraselular (eDNA). EPS berfungsi untuk memfasilitasi perlekatan, melindungi koloni dari neutrofil, menghindari deteksi fagosit, dan mengganggu antibodi serta faktor komplemen (Thomson, 2011; Davis *et al.*, 2006). Pembentukan dan regulasi seluruh komunitas dalam biofilm diatur molekul *signalling* yang diproduksi saat mikroorganisme mencapai jumlah tertentu. Fenomena ini disebut *quorum sensing* (QS) yang membantu ekspresi faktor virulensi (Nakagami *et al.*, 2011). Bakteri memproduksi dan melepas molekul *signalling* QS yang disebut *autoinducers*. Keuntungan bakteri hidup dalam biofilm antara lain stabilitas struktur, perlekatan kokoh ke suatu permukaan, virulensi tinggi, dan resistensi terhadap sistem imun dan pengobatan antimikroba (Davis *et al.*, 2008).

### 2.2.2 Pembentukan biofilm

Pembentukan biofilm dimulai setelah mikroorganisme melekat pada suatu permukaan. Beberapa bakteri yang memiliki motilitas rendah tak bisa membentuk biofilm karena tidak bisa mengenali dan melekat pada permukaan semudah bakteri motil. Setelah kolonisasi dimulai, biofilm terus tumbuh dengan cara pembelahan sel dan rekrutmen. Biofilm yang terbentuk sempurna memiliki matriks yang terdiri dari campuran *exopolysaccharide* dan bahan-bahan lain dari lingkungan sekitar, misalnya eritrosit (Donlan, 2002). Proses pembentukan biofilm dapat dilihat pada Gambar 2.3.



**Gambar 2.3 Proses Pembentukan Biofilm (Armitage, 2005)**

1. Sel-sel *S. aureus* menempel pada permukaan secara reversibel. Pada tahap ini, bakteri menggunakan berbagai macam organel dan protein ekstraseluler untuk deteksi dan perlekatan, seperti flagella, pili, fimbriae, serat, dan protein membran luar (Thomas *et al.*; 2004, Bullitt, 1995). Mereka menempel pada permukaan yang mengalami kontak atau berada di cairan yang mengandung elektrolit dan makromolekul seperti DNA dan protein yang dibentuk dari degradasi biomolekul. Organel dan protein tersebut digunakan untuk menilai sifat fisik dan kimia permukaan itu sebelum bakteri menempel (Lutolf and Hubbell, 2005). Interaksi dinding sel bakteri dengan permukaan atau dinding sel lain terutama dipengaruhi ikatan nonspesifik seperti gaya elektrostatis dan van der Waals (McClaine and Ford, 2002; Vigeant *et al.*, 2002). Faktor yang mempengaruhi perlekatan bakteri pada permukaan adalah keberadaan nutrisi, pH, suhu, konsentrasi elektrolit dan jenis permukaan (Costerton *et al.*, 2005).
2. Sel-sel menempel secara irreversibel, kemudian berproliferasi. Perlekatannya bersifat kimiawi. Sekresi *extracellular polymeric substance* (EPS) yang terdiri dari DNA, protein, lipid, dan lipopolisakarida bersama adhesin memfasilitasi pematatan dan perlekatan sel-sel itu dengan permukaan (Flemming and

Wingender, 2010). Aktivitas bakteri setelah perlekatan akan mengubah permukaan dengan produksi molekul anti adhesi (Banat *et al.*, 2010) dan *surface blanketing* untuk mencegah penempelan bakteri lain yang kompetitif (An *et al.*, 2006).

3. Sel-sel yang telah melekat bereplikasi dan tumbuh menjadi mikrokoloni yang memiliki diameter puluhan sampai ratusan mikron. Bakteri-bakteri ini makin banyak mensekresikan EPS dan menjadi terselubung dalam lapisan hidrogel, yang membentuk pelindung fisik antara komunitas bakteri dengan lingkungan luar. Komposisi EPS bervariasi tergantung spesies, kondisi saat tumbuh, dan komunikasi kimia antar sel dalam komunitas menstimulasi pembentukan dan sekresinya (Borlee *et al.*, 2010). *Quorum sensing* (QS) adalah contoh terbaik komunikasi ini. QS adalah proses penting dalam pembentukan biofilm dan merupakan mekanisme komunitas untuk berhubungan dengan lingkungan luar. QS memodulasi berbagai fungsi seluler, seperti patogenesis, asupan nutrisi, konjugasi, motilitas, dan produksi metabolit sekunder (Harmsen *et al.*, 2010).
4. Komunitas ini tumbuh menjadi struktur tiga dimensi dan menjadi biofilm sempurna setelah sel-sel bereplikasi dan EPS terakumulasi. Sel-sel dalam biofilm matur ini dilekatkan satu sama lain oleh EPS, yang menghalangi stres mekanik dan pelepasan komunitas dari permukaan. Pada tahap ini juga dapat terjadi perlekatan bakteri baru dari luar ke komunitas ini.
5. Beberapa sel lepas dari komunitas biofilm dan terdispersi ke dalam cairan, dimana mereka bisa berpindah, melekat pada permukaan baru, dan membentuk biofilm baru. Tahap ini penting untuk pembaruan koloni (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Dispersi adalah tahap terakhir siklus biofilm dan

melibatkan kematian sel, enzim degradasi matriks, serta motilitas seluler (Boles *et al.*, 2005; Karatan and Watnick, 2009).

### 2.2.3 Deteksi dan Pengukuran

Metode paling populer untuk meneliti biofilm adalah *Robbins device*, dengan melewati suspensi bakteri pada *flow cell* yang memiliki 24 *coupon* yang bisa dilepas, dimana sel bisa menempel dan membentuk biofilm. Metode *microtiter plate* juga biasa dilakukan. *Microtiter plate* diinokulasi dengan suspensi bakteri dan biofilm akan terbentuk pada permukaannya. Setelah 24 sampai 48 jam diinkubasi, sel bebas yang tak membentuk biofilm dibuang dengan mencucinya. Larutan kristal violet lalu ditambahkan untuk pewarnaan sel. Lalu dicuci lagi, dan pewarna yang terikat diekstrak dengan aseton-etanol kemudian dikuantifikasi dengan spektrofotometri. Metode ini memberi hasil kuantitatif dari massa sel-sel dalam biofilm dan sangat berguna jika akan mengukur kepekaan terhadap antimikroba (O'Toole and Kolter, 1998). Ada pula metode dilusi tabung (*tube test/tube dilution method*) yang merupakan salah satu tes pembentukan biofilm dengan penghitungan kualitatif dan semi kuantitatif. Metode ini secara sederhana dapat memperkirakan terbentuk atau tidaknya biofilm yang tercatat pada tabung berisi kultur bakteri. Pada dasarnya, koloni bakteri yang menempel pada suatu media mudah diwarnai dan diamati. Metode ini mendemonstrasikan adanya produksi *slime* bakteri (Christensen *et al.*, 2000). Karena metodenya sederhana, murah, dan mudah maka metode dilusi 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 *Nutrient Agar Plate* sebanyak 40 µl kemudian

diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam tadi 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 pembentukan biofilmnya. Tabung diperiksa dan jumlah formasi biofilm dinilai dengan penilaian objektif (Mathur, 2006).

#### 2.2.4 Resistensi Terhadap Antimikroba

Biofilm terlibat dalam sekitar 80% dari seluruh infeksi yang terjadi pada manusia, sedangkan terapi konvensional sangat tidak efektif karena *minimum inhibitory concentration* (MIC) antimikroba meningkat 10 hingga 1000 kali lipat dibanding pada organisme tanpa biofilm (Donlan and Costerton, 2002). Resistensi terjadi akibat dari salah satu mekanisme ini:

1. Tertundanya antimikroba dalam proses penetrasi. Butuh waktu yang lebih banyak untuk inaktivasi bakteri yang diselubungi *slime* seperti pada biofilm daripada untuk inaktivasi bakteri bebas. Sebuah penelitian menunjukkan *ciprofloxacin* pada biofilm *Pseudomonas aeruginosa* membutuhkan waktu 21 menit untuk penetrasi, dimana membutuhkan waktu 40 detik dalam keadaan tanpa biofilm (Hoyle *et al.*, 1992).
2. Adanya pertukaran plasmid yang mengandung gen resisten terhadap antimikroba tertentu antara bakteri-bakteri dalam biofilm (Donlan and Costerton, 2002).
3. Terdapat beberapa kandungan dari *extracellular polymeric substance* (EPS), material dari biofilm yang mempunyai efek inhibisi proses difusi antimikroba tertentu (Donlan and Costerton, 2002).

4. Modifikasi target antibiotik dengan mutasi target itu sendiri atau membentuk molekul protektif untuk mengalihkan antibiotik dari target awal (Patel, 2005).
5. Pertumbuhan sel yang lambat. Karena minimnya nutrisi, sel-sel biofilm memiliki tingkat pertumbuhan yang lambat. 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 kepekaan terhadap antibiotik (Pace *et al.*, 2006).
6. Ekspresi gen resisten. Penelitian genetik menunjukkan bahwa jumlah gen yang diekspresikan oleh biofilm lebih banyak daripada kultur sel bebas. Salah satu contoh ekspresi gen ditunjukkan oleh sel bakteri Gram negatif. Selama fase S, sel-sel bakteri Gram negatif melepas faktor resistensi berupa ekspresi gen-gen resisten yang dikenal sebagai RpoS. Gen RpoS diduga dapat membantu terjadinya *quorum sensing* atau interaksi antar sel yang berperan membentuk biofilm (Pace *et al.*, 2006).

## 2.2.5 Biofilm *Staphylococcus aureus*

### 2.2.5.1 Patogenesis dan Fisiologi

Penelitian menunjukkan bahwa *S. aureus* mudah membentuk biofilm. Biofilmnya bisa terbentuk pada *polystyrene plate* tanpa memerlukan kultur jaringan (Walnecka *et al.*, 2006). Ini menunjukkan bahwa mereka mudah beradaptasi dan menimbulkan ancaman penyakit. Beberapa penyakit seperti endokarditis dan osteomyelitis disebabkan biofilm *S. aureus* (Gotz, 2002). Keistimewaan pertama dari adanya biofilm adalah peningkatan yang dramatis

pada resistensi antimikroba. Untuk biofilm *S. aureus*, konsentrasi minimum bakterisidal *in vitro* pada kebanyakan agen antimikroba rata-rata antara 2 sampai 1000 kali lebih tinggi daripada bentuk bebasnya. Keistimewaan kedua adalah ketidakmampuan sel imun untuk membunuh bakteri pembentuk biofilm. Penelitian menunjukkan bahwa leukosit dapat mengikat dan melakukan penetrasi pada biofilm *Staphylococcus aureus*, tetapi tidak dapat memfagosit bakteri yang ada pada struktur biofilm tersebut. Operasi atau pemindahan implan menjelaskan bagaimana memindah bakteri secara mekanis (Satari, 2005).

#### 2.2.5.2 Molekul yang Berperan dalam Adhesi Bakteri

Adhesi bakteri pada permukaan yang merupakan tahap awal dari patogenesis biofilm ditentukan oleh kombinasi dari interaksi antara permukaan bakteri, permukaan substrat, dan lingkungan. Molekul pada kedua permukaan juga berpartisipasi pada interaksi reseptor ligan spesifik yang memacu adhesi. Pada akhirnya, faktor-faktor lain seperti aliran hidrodinamik, kondisi nutrisi, tekanan oksigen, dan pH berkontribusi pada seluruh proses (Satari, 2005). Asam teikoat adalah polimer anionik yang terdistribusi secara seragam pada seluruh dinding peptidoglikan *S. aureus*. Mereka mengandung banyak bagian yang dapat diglikosilasi atau diesterifikasi oleh asam amino dengan D-alanin. Penelitian menunjukkan bahwa hilangnya D-alanin ester pada asam teikoat 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 operon *dltABCD* yang responsif untuk penggabungan D-alanin pada asam teikoat. Diduga 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 autolisins. Protein ini merupakan peptidoglikan hidrolase, enzim yang memotong peptida atau setengah glikan pada dinding sel, lalu berpartisipasi dalam melisis sel dan pembelahan (Pace *et al.*, 2006). Adhesi bakteri pada permukaan polimer seperti *polystyrene* dapat dikaitkan pada beberapa situasi klinis. Sebagai contoh, bakteri dapat melekat ke polimer pada periode intermediet sebelum penempatan alat medis atau implan ke pasien. 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 inang dibandingkan dengan alat medis itu sendiri (Pace *et al.*, 2006). Protein permukaan *S. aureus* yang berpartisipasi dalam interaksi spesifik dapat mengenali matriks ekstraseluler dan protein plasma. Protein matriks ekstraseluler banyak terdapat pada luka, tulang, endotelium 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 *S. aureus* untuk menimbulkan infeksi (Jawetz *et al.*, 1996).

### 2.2.5.3 Molekul yang Berperan dalam Agregasi dan Produksi EPS

Setelah melekat pada suatu permukaan secara irreversibel, bakteri langsung memulai proses pematangan biofilm. Mikrokoloni bakteri terbentuk dengan agregasi, pembelahan, atau perekrutan sel. Sel-sel tersebut berinteraksi

dengan lingkungan untuk membentuk dan terus mempertebal EPS.

Pembentukan ini dibantu oleh beberapa molekul yaitu:

1. *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) atau *Polymeric N-Acetyl Glucosamine* (PNAG), disebut juga *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).
2. *Alpha-Toxin*, molekul yang juga mempengaruhi adhesi interseluler dan agregasi pada *Staphylococcus aureus*. *Alpha-toxin* adalah eksotoksin yang dapat melisiskan sel inang dengan berkumpul menjadi heptamer dan berfungsi sebagai pori pada membran sel eukariotik. Penelitian menunjukkan bahwa *alpha-toxin* berperan pada tahap awal infeksi yang terkait dengan biofilm (Pace *et al.*, 2006).
3. *Biofilm Associated Protein* (Bap), merupakan protein permukaan yang pertama kali diidentifikasi, berfungsi untuk mempengaruhi tahap pertama dan kedua pembentukan biofilm *in vitro*. Bap memicu pelekatan pada *polystyrene* via interaksi hidrofobik nonspesifik (Pace *et al.*, 2006).
4. *Quorum sensing*, komunikasi antar sel dengan sinyal ekstraseluler yang dihasilkan bakteri saat kepadatan sel tinggi. *Quorum sensing* mengatur dan mengkoordinasi ekspresi faktor-faktor virulensi 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 inang dan predominasi metabolisme (Pace *et al.*, 2006).

### 2.3 Mawar (*Rosa indica*)

Mawar adalah tumbuhan dari genus *Rosa*, keluarga Rosaceae. Ada lebih dari 100 spesies mawar di dunia (Horn, 1992). Spesies dari berbagai belahan dunia mudah sekali disilangkan, yang menyebabkan makin banyaknya jenis mawar taman (Sahoo *et al.*, 2011). Mawar yang digunakan dalam penelitian ini adalah mawar spesies *Rosa indica*.

#### 2.3.1 Taksonomi

Kebanyakan spesies mawar berasal dari Asia, beberapa dari Eropa, Amerika Utara, dan Afrika Barat serta Utara (Horn, 1992). Berikut adalah taksonomi dari tanaman mawar.



Gambar 2.4 Tumbuhan Mawar (Asfara, 2013)

Kingdom: Plantae

Division: Tracheophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Rosales

Family: Rosaceae

Genus: *Rosa* L.

Species: *Rosa indica* (ITIS, 2011)

### 2.3.2 Morfologi

Mawar membentuk sekelompok semak tegak dan merambat dengan tangkai yang berduri. Bunganya besar dan khas, ada di ujung tangkai dengan berbagai warna mulai dari putih sampai kuning dan merah. Daunnya berserat dan oval. Buahnya oval, hijau, dan memiliki beberapa biji. Mawar memiliki ukuran beragam, dari yang kecil dan sederhana hingga tanaman merambat yang bisa mencapai tinggi 7 meter (Sahoo *et al.*, 2011).

### 2.3.3 Kandungan Kimia

Sejak dahulu mahkota bunga mawar dipercaya memiliki manfaat medis. Hasil olahan mahkota bunga mawar sudah banyak dikonsumsi masyarakat, misalnya air seduhannya yang bisa diminum seperti teh. Air seduhan ini bersifat sedatif ringan dan membuat rileks. Di Malaysia air seduhan mawar biasa digunakan dalam minuman seperti susu yang manis (Wallace, 2012). Setelah diteliti, ternyata mahkota bunga mawar memang memiliki banyak kandungan kimia yang bermanfaat. Beberapa di antaranya adalah flavonoid, terpena, dan tannin.

#### 2.3.3.1 Flavonoid

*Quercetin* dan *kaempferol* adalah flavonoid yang penting dan paling umum ditemukan pada semua tumbuhan. *Kaempferol* yang terkandung dalam mahkota bunga mawar adalah sebanyak 18%, sedangkan *quercetin* yang terkandung sebanyak 2.4%. Senyawa aktifnya berbentuk glikosida dengan glukosa terikat pada posisi C-3. Di daun, flavonoid diduga membantu ketahanan

fisiologis tanaman, misalnya melindungi dari patogen jamur dan radiasi UV-B (Harborne and Baxter, 1999). Penelitian menunjukkan bahwa flavonoid memiliki banyak efek baik untuk manusia, seperti antiinflamasi, estrogenik, inhibisi enzim, antimikroba, antialergi, antioksidan, dan antitumor (Harborne and Williams, 2000). Efek flavonoid melawan patogen disebabkan karena mereka menghambat perlekatan dan mengganggu permeabilitas dinding sel di mikroorganisme dengan menghambat asam amino di porin (Alvarez *et al.*, 2008). Aktivasinya juga bisa karena kemampuannya membentuk kompleks dengan protein ekstraselular dan kemudian secara tak langsung mempengaruhi dinding sel (Tsuchiya *et al.*, 1996)

#### 2.3.3.2 Terpene

Terpene adalah senyawa alami yang dikenal aman untuk digunakan. Carvone, salah satu jenis terpene yang memiliki sifat antibakteri dan antifungal, telah digunakan selama berabad-abad dalam ekstrak minyak biji, jauh sebelum mekanismenya diteliti (de Carvalho, 2006). Sedangkan triterpene saponin mengurangi tegangan permukaan biofilm sehingga mengganggu proses pelepasan (Wiersma, 1999). Kadang senyawa mirip terpene yang disebut terpenoid juga dimasukkan golongan terpene, yang berfungsi untuk merusak membran lipofilik mikroba (Cowan, 1999). *Farnesol* dan *citronellol* adalah terpene yang paling sering ditemukan pada mawar, dan memiliki sifat antimikroba. *Farnesol* yang terkandung dalam mawar adalah sebesar 2%, sedangkan *citronellol* yang terkandung sebesar 11.7% (Gupta *et al.*, 2000).

#### 2.3.3.3 Tannin

Tannin ada pada hampir semua tumbuhan dan bersifat antibiotik. Tannin membuat rasa asam pada buah yang masih muda. Senyawa ini banyak terdapat dalam buah muda untuk melindunginya dari infeksi mikroba. Mereka juga aman

digunakan manusia, baik di dalam makanan maupun minuman (Liu *et al.*, 2006; *Food and Drug Administration*, 2013). Kandungan tannin dalam mahkota bunga mawar adalah sekitar 1.5%. Senyawa ini memiliki sifat antiperoksida kuat yang diduga berperan dalam inaktivasi adhesi mikroba, enzimnya, dan protein transpor serta dinding sel bakteri (Okuda, 2005). Aktivitas antioksidannya disebabkan kemampuannya mengikat dan membuang radikal bebas, logam dan menghambat enzim prooksidatif serta peroksidasi lipid (Koleckar *et al.*, 2008). Mereka juga menghambat pertumbuhan bakteri pada makanan, sehingga sering digunakan untuk menambah masa penyimpanan makanan tertentu (Chung *et al.*, 1998).

