BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram negatif aerob obligat, berkapsul, mempunyai flagela polar sehingga bersifat motil, berukuran sekitar 0,5-1,0 µm. Bakteri ini tidak menghasilkan spora dan tidak dapat menfermentasikan karbohidrat (Toyofoku, 2011). Bakteri Gram negatif ini dapat muncul dalam bentuk tunggal, berpasangan atau kadang-kadang dalam bentuk rantai pendek (Brook *et al.*, 2004).

Pseudomonas aeruginosa membentuk biofilm untuk membantu kelangsungan hidupnya saat membentuk koloni. Koloni yang dibentuk halus bulat berwarna hijau dan mampu berfluoresensi. Biofilm pada *P. aeruginosa* terbuat dari kapsul glikokalis untuk mengurangi keefektifan mekanisme sistem imun inang (Esmaeili dan Hashemi, 2011).

Beberapa strain *P. aeruginosa* dapat menghasilkan lendir ekstraseluler yang kental, yang kemudian membentuk koloni mukoid akibat produksi berlebihan dari alginat, yaitu suatu lendir eksopolisakarida. Koloni mukoid ini sering ditemukan pada biakan dari pasien dengan *cystic fibrosis*, yang eksopolisakaridanya berfungsi untuk menghasilkan matriks sehingga organisme dapat hidup dalam biofilm. Arsitektur dari membran tersebut yang menyebabkan resistensi *P. aeruginosa* terhadap banyak antibiotik (Kayser *et al*., 2005).

Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Pseudomonas aeruginosa* (Todar, 2012)

2.1.1 Taksonomi *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam genus Pseudomonas, yang ditentukan oleh Migula pada tahun 1984. Golongan yang termasuk dalam genus tersebut adalah bakteri gram negatif, berbentuk tangkai polar dan berflagel. Berikut adalah taksonomi dari bakteri *P. aeruginosa* : (Holt *et al*., 1994)

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Ordo : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.2 Karakteristik Bakteri

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang lurus atau lengkung, berukuran sekitar 0,6 x2 µm. Bakteri ini dapat ditemukan satu - satu, berpasangan dan kadang - kadang membentuk rantai pendek. *Pseudomonas*

aeruginosa tidak mempunyai spora, serta mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak (Brooks *et al.,* 2005 ; Madigan *et al*., 2003).

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri aerob obligat yang tumbuh dengan mudah pada banyak jenis media pembiakan, karena memiliki kebutuhan nutrisi yang sangat sederhana. Medium paling sederhana di laboratorium untuk pertumbuhan bakteri ini terdiri dari asetat (sebagai sumber karbon) dan amonium sulfat (sebagai sumber nitrogen). Metabolisme bersifat aerob tetapi dapat tumbuh tanpa O_2 bila tersedia NO_3 sebagai akseptor elektron (Todar, 2004 ; Brooks *et al.,* 2005).

Pseudomonas aeruginosa tumbuh baik pada suhu 37 - 42º C. Pertumbuhan pada suhu 42º C membantu membedakannya dari spesies *Pseudomonas* lain dalam kelompok fluorosen. Bakteri ini menghasilkan reaksi oksidase positif dan tidak memfermentasikan laktosa, tetapi banyak strain mengoksidasi glukosa.(Brooks *et al.,* 2001 ; Balows *et al*., 1991).

Pembiakan *Pseudomonas aeruginosa* dari spesimen klinik biasanya menghasilkan satu atau dua tipe koloni yang halus (Todar, 2004 ; Madigan *et al*., 2003).:

1. Koloni besar dan halus dengan permukaan rata dan meninggi (*fried egg appearance).*
2. Koloni halus dan mukoid sebagai hasil produksi berlebihan dari alginat. Tipe ini sering didapat dari sekresi saluran pernafasan dan saluran kemih.

2.1.3 Biofilm

Biofilm merupakan kumpulan dari sel - sel mikroba yang melekat secara ireversibel pada suatu permukaan. Kumpulan sel - sel bakteri ini terbungkus dalam matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri. Kumpulan sel bakteri ini juga memperlihatkan adanya perubahan fenotip seperti perubahan tingkat pertumbuhan dan perubahan transkripsi gen dari sel planktonik atau sel bebasnya (Donlan *et al*., 2002). Pada populasi bakteri yang melekat pada permukaan dan membentuk matriks namun tidak mempunyai sifat fenotip dari biofilm, tidak dapat menjadi biofilm yang sesungguhnya (Maier,2009).

Biofilm terutama terdiri dari materi matriks (85% dari volume) dan kumpulan sel-sel bakteri (15 % dari volume). *Extracellular Polymeric Substances* menyusun 50%-90% karbon organik biofilm dan dapat dianggap sebagai material matrik yang utama. Biofilm mampu menetralkan pengaruh buruk lingkungan seperti pH ekstrim, tipisnya kandungan oksigen serta tekanan dan suhu yang ekstrim. Lebih jauh, sel-sel biofilm dapat saling memisahkan diri dan bergabung dengan sistem matriks EPS lainnya (Midelet dan Carpentier, 2004), oleh karena itu sulit untuk menekan pertumbuhan biofilm.

2.1.3.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Proses pembentukan biofilm terdiri dari beberapa tahap. Pada tahap pertama, sel-sel bakteri saling menempel pada permukaan bahan akibat pengaruh gaya *van der Waals* (Montana State University, 2008). Bakteri yang hidup bebas (sel planktonik) melekat pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Pada saat ini, pembelahan akan berhenti selama beberapa jam dan terjadi banyak perubahan sel planktonik menjadi

sel dengan fenotip biofilm. Sel biofilm berbeda secara metabolik dan fisiologik dari sel planktoniknya. Pada tahap ini, proses perlekatan sel masih bersifat sementara.

Kemudian, sel-sel bakteri telah menempel secara permanen akibat terbentuknya matriks EPS. Matriks ini merupakan suatu senyawa perekat yang melekatkan bakteri pada satu permukaan dan melekatkan satu sama lain pada *monolayer* yang dikenal sebagai *linking film* yaitu suatu substrat yang menjadi tempat sel bakteri melekat dan membentuk suatu mikrokoloni (Oliveira *et al.,* 2006)

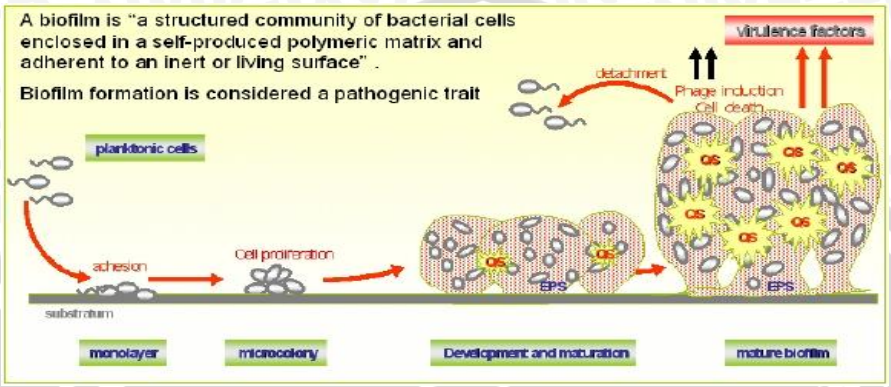
Tahap berikutnya ditandai dengan terbentuknya mikrokoloni. Pada tahap inilah biofilm mulai terbentuk. Biofilm akan terbentuk semakin tebal dan membentuk struktur tiga dimensi yang mengandung sel-sel terselubung dalam beberapa kelompok yang saling terhubung satu sama lainnya (Montana State University, 2008).

Pada tahap terakhir perkembangan struktur biofilm terjadi dispersi sel sehingga sel-sel tersebut berpindah dan membentuk biofilm yang baru (Renner, 2011). Pada biofilm yang sudah terbentuk proses pembelahan sel jarang terjadi. Pada kondisi tersebut, sel-sel biofilm menggunakan sebagian besar energi untuk membentuk eksopolisakarida yang dibutuhkan sel sebagai nutrisi (Watnick and Kolter, 2000).

2.1.3.2 Pembentukan Biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*

Pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* pada umumnya sama dengan pembentukan biofilm pada bakteri lainnya. Dalam perkembangannya, sel - sel bakteri dalam matriks akan mengeluarkan sinyal kimia. Molekul sinyal ini berperan dalam koordinasi aktivitas biofilm dan pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang. Aksi dari sinyal ini merupakan suatu proses dari *quorum*

sensing yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan suatu aksi bergantung pada konsentrasi sinyal dalam lingkungan.



Gambar 2.2 Pembentukan Biofilm (Kievit, 2009)

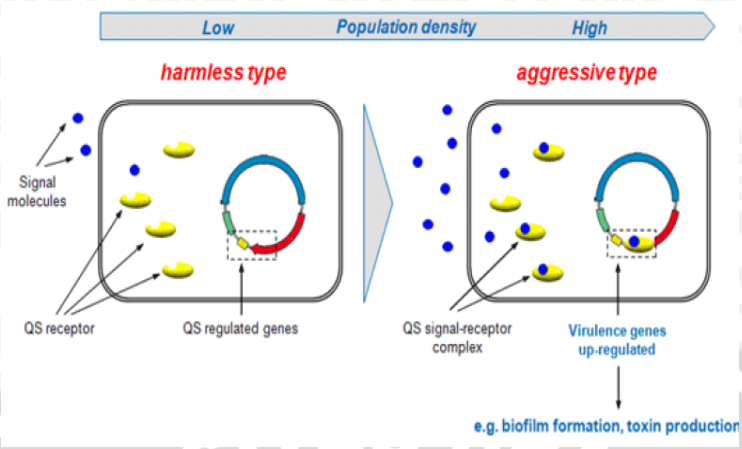
Quorum sensing digunakan sel-sel bakteri untuk berkolaborasi satu sama lainnya sehingga bermanfaat bagi keseluruhan populasi mikroorganisme pembentuk biofilm (Smith *et al*., 2004). Sementara itu, struktur mikrokoloni yang ada akan senantiasa berupaya membentuk jaringan sel kompleks yang menopang sistem kehidupan secara kolektif. Saluran penghubung diantara kelompok-kelompok sel berperan untuk mengirimkan air dan nutrisi ke setiap bagian sel dan membantu pengeluaran zat-zat sisa metabolisme. Karakteristik seperti yang telah disebutkan sebelumnya ditambah adanya sifat kohesif yang kuat dan memuaskan performanya membuat biofilm sangat tahan terhadap pengaruh antibiotik (Westgate *et al.,* 2011).

2.1.3.3 *Quorum Sensing*

Bakteri sangat interaktif dan dapat berkomunikasi satu sama lain melalui proses yang dikenal sebagai *quorum sensing* untuk menghasilkan perilaku kolektif

dalam suatu populasi (Singh *et al.*, 2009). Bakteri menggunakan sinyal kimia yang disebut dengan *autoinducer* untuk berkomunikasi.Bakteri Gram positif menggunakan molekul berbasis peptida untuk saling berkomunikasi, sementara bakteri Gram negatif menggunakan *autoinducer* berupa senyawa *N-acyl homoserine lactone* (AHL) yang mengatur sejumlah fungsi biologis seperti sifat patogen dan pembentukan biofilm. *N-acyl homoserine lactone* (AHL) disintesis oleh kelompok protein homolog LuxI. Jika konsentrasinya telah batas tertentu, AHL akan berikatan dengan molekul reseptor (LuxR) yang menyebabkan aktivasi pembentukkan dimer atau multimer kompleks LuxRAHL. Kompleks ini berperan sebagai regulator transkripsi pada gen target sistem *quorum sensing* (Parsek dan Greenberg, 2000).

Quorum sensing adalah mekanisme regulasi genetik pada bakteri Gram negatif dan positif sebagai respon terhadap perubahan densitas populasi mikroorganisme dan ekspresi dari gen tertentu. Jika level sinyal molekul telah mencapai batas tertentu, densitas populasi mikroorganisme akan mencapai jumlah yang cukup sehingga dapat menghasilkan respon secara kolektif (Henzer dan Givskov, 2003).



Gambar 2.3 Interaksi Signal Molekul QS dan Reseptor QS (Hentzer *et al.,* 2003)

Mekanisme ini merupakan mekanisme bakteri patogen untuk menghindar dari sistem kekebalan tubuh dengan cara menunda bertemunya sinyal molekul dan reseptor sampai bakteri tersebut mencapai jumlah yang cukup untuk membentuk biofilm dan memulai penyebaran infeksi.(Henzer dan Givskov, 2003). Bakteri Gram positif dan Gram negatif menggunakan sistem komunikasi *quorum sensing* untuk regulasi bermacam-macam aktivitas fisiologi termasuk sekresi faktor virulensi, pembentukkan biofilm, kompetensi, motilitas, sporulasi, *bioluminescence*, dan pertukaran DNA yang memfasilitasi patogenisitas bakteri.

2.1.3.4 *Quorum sensing* (QS) pada *P. aeruginosa*

Dalam beberapa tahun terakhir, sebagian besar penelitian tentang mikroorganisme terkait *quorum sensing* dilakukan dengan menggunakan bakteri uji *P. aeruginosa*. Bakteri ini bersifat patogen pada manusia dan bertanggung jawab terhadap infeksi oportunistik pada pasien kanker, AIDS, dan *cystic fibrosis* (Smith *et al*., 2002). Berbagai macam enzim ekstraseluler berkontribusi terhadap virulensi *P.*

aeruginosa, termasuk elastase, protease, hemolisin, eksotoksin A, biosurfaktan rhamnolipid dan fosfolipase. Enzim-enzim ekstraseluler ini secara kolektif mampu menyebabkan kerusakan luas pada jaringan manusia atau mamalia lainnya (Van Delden dan Iglewski, 1998).

Sistem QS di *P. aeruginosa* terdiri dari dua sistem yaitu Las dan Rhl. Sistem Las yang merupakan kependekan dari elastase yaitu suatu enzim pemotong, terdiri dari dua protein aktivator transkripsi yaitu LasR dan LasI yang secara langsung mengatur sintesis *autoinducer* PAI-1 (*N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone*). PAI-1 ini mengatur ekspresi LasA (LasA protease), apr (alkaline protease), tox A (exotoxin A), LasI (PAI-1 syntease), dan LasB (elastase) (Jass, 2003).

Sistem RhI yang merupakan kependekan dari *rhamnosyltransferase* yaitu suatu enzim yang memproduksi rhamnolip. Sistem ini terdiri dari protein aktivator transkripsi RhlR dan RhlI yang secara langsung mengatur sintesis *autoinducer* PAI-2 (*N-butyoyl-1-homoserine lactone*) atau sering disingkat BHL. *Autoinducer* PAI-2 ini akan terikat pada RhlR. Kompleks ini akan mengaktivasi RhlI, RhlA dan RhlB, suatu operon pengkode *rhamnosytransferase* yang diperlukan pada produksi biosurfaktan rhamnolipid. Senyawa ini dapat mengurangi tegangan permukaan dan dengan demikian memungkinkan sel *P. aeruginosa* untuk menggerombol (*swarm*) pada permukaan semi padat. Sistem Las (protein aktivator LasR dan PAI-1) berperan dalam regulasi ekspresi RhlR dengan mengaktivasi faktor transkripsi dari RhlR tersebut. (Dong dan Zhang, 2005).

Bakteri akan mengupayakan perlindungan diri terhadap pengaruh lingkungan luar yang mengancam kelangsungan hidupnya dengan membenuk lapisan yang disebut biofilm. Hal ini merupakan suatu respon biologis yang normal dari bakteri. *Pseudomonas aeruginosa* juga menggunakan QS untuk mengontrol pembentukan

biofilm (Costerton *et al*., 1999). Biofilm dapat melindungi organisme dari sistem pertahanan sel inang dan menyebabkan peningkatan resistensi terhadap antibiotik (Smith *et al*., 2002).

2.2 Teh *(Camellia sinensis)*

Salah satu dari beberapa tanaman herbal yang telah diketahui memiliki sifat antimikroba dan antiinflamasi adalah teh (*Camellia sinensis*). Teh merupakan minuman yang populer dan telah lama dikonsumsi oleh masyarakat. Berdasarkan cara pengelolaannya terdapat empat jenis teh yaitu teh yang tidak terfermentasi (teh hijau / *green tea)*, teh yang terfermentasi (teh hitam / *black tea)*, daun teh yang sangat muda (teh putih / *white tea)* dan teh yang semi-terfermentasi *(oolong tea)* (Jigisha *et al*., 2012 ; Gupta *et al*., 2014).

2.2.1 Morfologi Teh *(Camellia sinensis)*

Daun teh berbau khas aromatik dengan rasa yang agak pahit. Daun teh mempunyai ciri–ciri (morfologi) berupa helai–helai daun yang cukup tebal, kaku, berbentuk sudip melebar sampai sudip memanjang dengan panjang yang tidak lebih dari 5 cm dan bertangkai pendek. Permukaan daun teh bagian atas akan nampak mengkilat, sedangkan pada daun yang muda permukaan bawahnya berambut. Jika telah tua, permukaan bawah daun akan menjadi licin. Selain itu tepi daun bergerigi, agak tergulung ke bawah, berkelenjar yang khas dan terbenam (Kartasapoetra, 1992). *Camellia sinensis* sendiri memiliki dua varietas yakni *var.assamica* yang berasal dari Assam (India) dan *var.sinensis* yang berasal dari Cina. Varietas assamica daunnya agak besar dengan ujung yang runcing. Varian teh ini biasanya digunakan untuk memproduksi jenis minuman teh hitam. Varietas sinensis daunnya

lebih kecil dan ujungnya agak tumpul. Daun teh jenis ini biasanya digunakan untuk memproduksi jenis teh hijau atau *green tea* (Sujayanto, 2008).

.

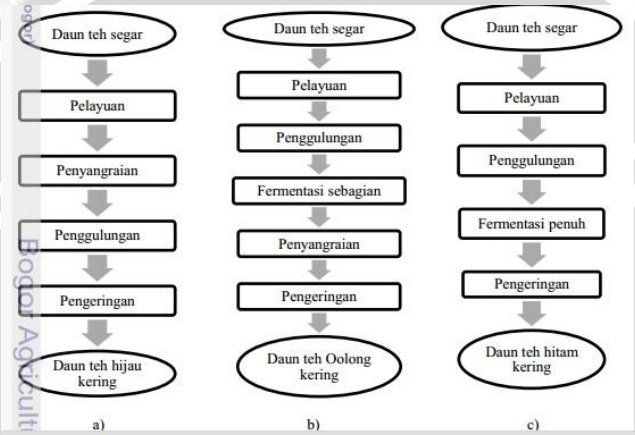
Gambar 2.4 Dedaunan *Camellia sinensis* (Boldt, 2004)

2.2.2 Teh Hijau *(Camellia sinensis var.assamica)*

Teh hijau diperoleh tanpa proses fermentasi (oksidasi enzimatis). Teh ini dibuat dengan cara menginaktifkan enzim fenolase yang ada dalam pucuk daun teh segar melalui pemanasan sehingga oksidasi terhadap katekin (zat antioksidan) dapat dicegah. Pemanasan dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan udara kering (pemanggangan/sangrai) dan pemanasan basah dengan uap panas (steam). Cara pertama biasa dijumpai pada pengolahan teh hijau Cina. Sementara cara kedua biasa digunakan pada pengolahan teh hijau Jepang atau biasa disebut *sencha* (Lee, 2009). Pada kedua metode tersebut, daun teh sama-sama menjadi layu, tetapi karena daun teh ini segera dipanaskan setelah pemetikan, maka hasil tehnya tetap berwarna hijau (Alamsyah, 2006)

Proses fermentasi mengoksidasi banyak komponen polifenol dan mendegradasi komponen aktif di dalamnya sehingga dapat menurunkan potensi

antimikroba teh. Tidak seperti teh hitam dan teh *oolong,* teh hijau merupakan teh yang tidak terfermentasi. Oleh karena itu, teh hijau mengandung konsentrasi polifenol yang paling tinggi dan memiliki efek antimikroba yang paling baik di antara teh lainnya (Sinija *et al*., 2008).



Gambar 2.5 Diagram alir pengolahan teh (Sativa , 2011)

2.2.3 Taksonomi Teh Hijau *(Camellia sinensis var.assamica)*

Taksonomi dari tanaman teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Ericales

Famili : Theaceae

Genus : Camellia

Spesies : *Camellia sinensis*

Varietas : var. *Assamica*

(Syamsulbahri, 1996)

2.2.4 Teh Hijau sebagai Antibakteri

Kandungan teh yang berperan sebagai antibakteri adalah katekin. Katekin merupakan prekursor pembentuk tanin. Tanin termasuk dalam kelompok polifenol yang menghambat fungsi membran sitoplasma dan mendenaturasi protein. Katekin menghancurkan membran lipid bilayer sehingga sel kehilangan struktur dan fungsinya dan menjadi lisis (Hartoyo, 2003)

Epigalokatekin, epigalokatekin gallat dan flavanol memiliki peran utama dalam menghambat sintesis asam lemak bakteri (Zhang, 2004). Asam lemak dalam bakteri digunakan terutama untuk membentuk membran sel bakteri. Oleh karena adanya hambatan sintesis asam lemak, maka pembentukan membran sel bakteri pun terganggu. Hal ini mengakibatkan struktur dan fungsi membran sel bakteri rusak dan pada akhirnya sel bakteri akan mengalami lisis dan mati (Yoon *et al., 2013*).

Sifat katekin yang sangat larut air dan lipofilik menyebabkan katekin sangat mudah melekat pada protein bakteri serta toksin yang dihasilkan bakteri. Sehingga terbentuk ikatan yang menghambat perlekatan pada sel tubuh manusia (Zhang, 2004).

2.2.4.1 Tanin

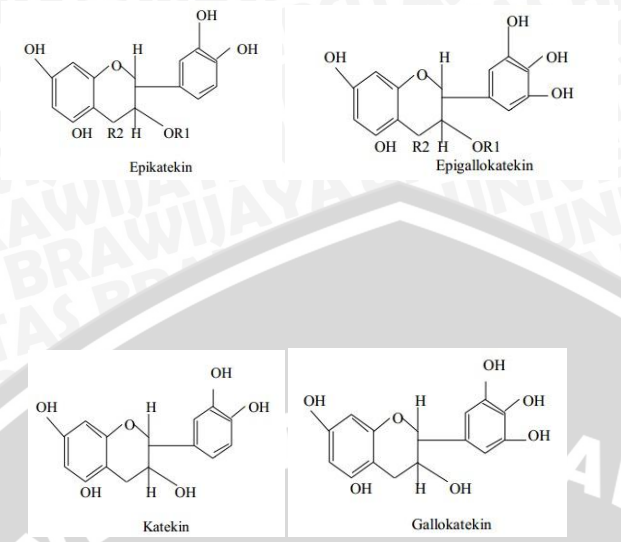
Tanin merupakan senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa polifenol (Hartoyo, 2003). Tanin mempunyai kemampuan mengendapkan protein karena tanin memiliki kemampuan untuk berikatan kuat dengan molekul protein sehingga dapat menghasilkan ikatan silang (Alamsyah, 2006). Tanin pada tanaman diklasifikasikan sebagai tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis merupakan jenis tanin yang mempunyai struktur poliester yang mudah dihidrolisis oleh asam atau enzim. Hasil hidrolisisnya adalah suatu asam polifenolat dan gula sederhana.

Golongan tanin ini dapat dihidrolisis dengan asam, mineral panas dan enzim-enzim saluran pencernaan. Tanin terkondensasi, atau yang sering disebut proantosianidin, merupakan polimer dari katekin dan epikatekin (Zhang, 2004).

2.2.4.2 Katekin (Polifenol)

Polifenol teh, atau sering disebut dengan katekin, merupakan zat yang unik karena berbeda dengan katekin yang terdapat pada tanaman lain. Katekin dalam teh tidak tidak berpengaruh buruk terhadap pencernaan makanan. Katekin teh memiliki sifat antimikroba (bakteri dan virus), antioksidan, antiradiasi, memperkuat pembuluh darah, melancarkan sekresi air seni, dan menghambat pertumbuhan sel kanker.Katekin merupakan kelompok utama dari substansi teh hijau dan paling berpengaruh terhadap seluruh komponen teh (Huber, 2003).

Katekin memiliki sifat tidak berwarna, larut air, dan katekin dapat berhubungan secara langsung maupun tidak langsung dalam sifat produk - produk teh, baik dari segi rasa, warna dan aroma. Kandungan katekin yang ditemukan pada teh hijau adalah *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG) dan *epigallocatechin* (EGC) (Cabrera *et al*., 2006; Jigisha *et al*., 2012). EGCG, katekin yang paling banyak ditemukan dalam teh hijau, kandungannya ditemukan sebanyak 65% dari total katekin yang ada pada ekstrak daun teh hijau (Maeyama, 2005).



Gambar 2.6 Susunan dari *Cathecin, Gallocathecin,* Epikatekin, dan *Epigallocathecin* (Yamanishi, 1968)

2.2.5 Senyawa Penghambat Biofilm

2.2.5.1 Tanin

Tanin dapat menghambat sinyal pada mekanisme *quorum sensing* dengan berikatan kuat dengan molekul protein sehingga menghasilkan ikatan silang meskipun efek yang ditimbulkan tidak signifikan (Huber, 2003).

2.2.5.2 Katekin (Polifenol)

Senyawa polifenol pada teh hijau terdiri dari empat komponen senyawa utama yakni *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG) dan *epigallocatechin* (EGC) . Senyawa EGCG yang terdapat dalam polifenol ini mampu menghambat biofilm dengan cara menurunkan pertumbuhan sel bakteri pada dosis tinggi dan menginhibisi *quorum sensing*. Pada pemberian yang

mencapai konsentrasi tertentu, EGCG dapat mereduksi intensitas sinyal pada *quorum sensing* bakteri hingga 50% (Maeyama, 2005).

Epigallocatechin gallate yang terdapat dalam polifenol dapat mengurangi daya motilitas dan ketebalan biofilm yang dibentuk bakteri secara signifikan (Huber, 2010). Selain itu EGCG berperan dalam aktivitas perusakan biofilm. Aktivitas ini meliputi penempelan pada koloni bakteri, pendegradasian eksopolisakarida, dan perusakan membran pada bakteri (Maeyama, 2005). *Epigallocatechin gallate* mengintervensi polisakarida yang membentuk glycocalix, dan menghambat interaksi antar sel maupun dengan dinding sel sehingga mereduksi jumlah lendir yang diproduksi untuk perlekatan koloni. *Epigallocatechin gallate* juga dapat mengikat peptidoglikan dan merusak kekuatan dinding sel bakteri sehingga fase awal pembentukan biofilm yang membutuhkan interaksi hidrofobik antar dinding sel bakteri dengan permukaan yang akan terkolonisasi dapat diintervensi (Blanco *et al.*, 2013).