

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif, berbentuk seperti kumpulan anggur dan menghasilkan hasil positif pada tes katalase. *Staphylococcus* merupakan bakteri fakultatif anaerob yang termasuk normal flora di kulit dan hidung manusia (Todar, 2008). Bakteri ini merupakan patogen oportunistik yang dapat berkolonisasi di hidung dan tenggorokan. Kolonisasi ini diketahui menjadi faktor resiko dari beberapa jenis infeksi, seperti bacteremia, infeksi pasca operasi, infeksi ulkus diabetes, dan lain-lain (Syed *et al.*, 2014).

2.2 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang menjadi penyebab beberapa infeksi yang sulit disembuhkan pada manusia. MRSA merupakan salah satu strain dari *Staphylococcus aureus* yang berkembang melalui proses seleksi alam, sehingga resisten terhadap antibiotic beta lactam, yaitu penisilin dan sefalosporin (McDougal *et al.*, 2003).

2.2.1 Taksonomi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus dapat dikelompokkan ke dalam bakteri gram positif (Brooks *et al.*, 2007). Berikut adalah taksonomi dari bakteri *S. aureus* :

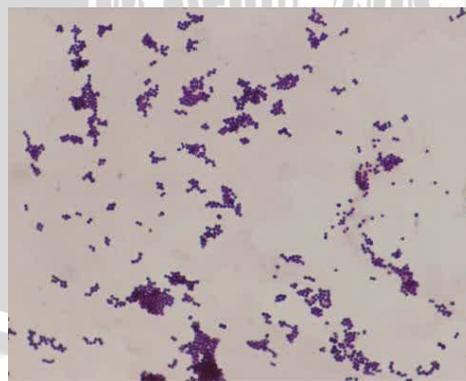
Domain : *Bacteria*
Kingdom : *Eubacteria*
Phylum : *Firmicutes*

Kelas : *Bacilli*
Ordo : *Bacillales*
Family : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Species : *Staphylococcus aureus*
Subspecies : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
(Domrachev *et al.*, 2002)

2.2.2 Karakteristik Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

2.2.2.1 Morfologi

Secara mikroskopik, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* diidentifikasi sebagai gram positif yang memiliki karakteristik kokus dengan diameter 0,5-0,7 μm (Haddadin *et al.*, 2002). Bakteri ini memiliki dinding sel yang terbentuk dari lapisan peptidoglikan. Mereka mampu membentuk koloni dan tidak memiliki flagella (Kuroda *et al.*, 2001). Bakteri ini merupakan bakteri yang tidak motil dan tidak membentuk spora (Brooks *et al.*, 2007).



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* dengan Ciri Khas Bergerombol Seperti Anggur (Carroll, 2008)

2.2.2.2 Sifat Kultur

Kolonisasi MRSA dapat dilihat dengan kultur bakteri atau tes molecular dengan identifikasi DNA dan gen resistensi MRSA. *Nasal swab* dilakukan pada nostril dan dikultur. Kultur MRSA positif ditandai dengan pertumbuhan koloni pada media Mueller Hinton Agar dan Natrium Klorida. Campuran kedua media menghasilkan pertumbuhan bakteri pada pH 7,3 dan optimal pada suhu 25⁰C.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri fakultatif anaerob yang tumbuh optimal pada suhu 37⁰C dan pH 7,5 (Ruzin *and* Novick, 2000).

Bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada media agar nutrient dengan menghasilkan pigmen berwarna keemasan sedangkan pada media darah akan terbentuk zona transparan di sekitar koloni akibat beta hemolisin (Riyono, 2011).

Mannitol Salt Agar yang terdiri dari 1% manitol, 7,5% natrium klorida dan fenol merah sebagai indikator, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* memfermentasikan manitol dengan tanda munculnya zona kuning di sekitar koloni (Amini *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Media *Blood Agar* (Vergidis *and* Patel, 2010)

2.2.2.3 Sifat Pertumbuhan

Bakteri bereproduksi secara aseksual, termasuk Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Dengan *binary fusion*, *S.aureus* dapat terbagi menjadi dua bagian yang hampir sama besar yang seringnya tidak berpisah (Kraus and Preschel, 2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* memfermentasikan karbohidrat dan menghasilkan asam laktat tanpa menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik bervariasi. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* relatif resisten terhadap pengeringan, panas (suhu 50°C, 30 menit) dan natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh bahan kimia seperti heksaklorofen 3% (Brooks et al., 2007)

2.2.3 Metabolit Bakterial

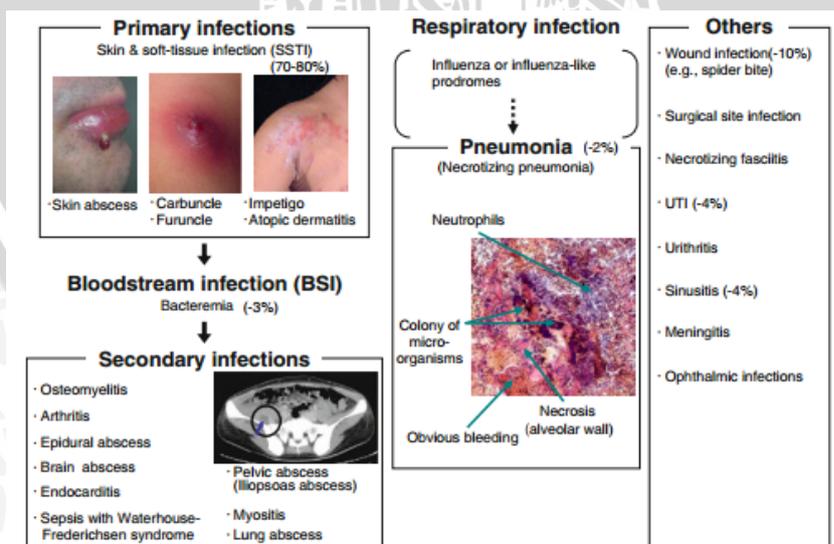
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* menyebabkan infeksi dengan cara menghasilkan substansi ekstraselular. Baik toksin maupun enzim yang termasuk substansi tersebut dikontrol oleh plasmid genetik atau dapat juga dikendalikan kromosomal dan ekstrakromosomal (Brooks et al., 2007). *S. aureus* mengekspresikan beberapa faktor virulen potensial, seperti: protein permukaan yang meningkatkan kolonisasi pada jaringan inang, invasin yang meningkatkan penyebaran bakteri di jaringan (leukosidin, kinase, hyaluronidase), faktor-faktor permukaan yang mencegah fagositosis (kapsul, Protein A), bahan-bahan biokimia yang menguatkan pertahanan dari fagosit (karotenoid, katalase), bahan-bahan imunologis (Protein A, koagulase), toksin pemecah membran yang melisiskan membran sel eukariot (hemolisin, leukotoksin, leukosidin), eksotoksin yang mampu merusak jaringan inang (SEA-G, TSST, ET), dan kemampuan resisten dari antimikroba (Todar, 2008).

2.2.4 Patogenesis

Struktur anatomis dari kulit menjadi penghalang terhadap infeksi namun juga memberi peluang terjadinya infeksi. Infeksi terjadi melalui dua mekanisme. Mekanisme tersering yaitu apabila terdapat luka mekanis terhadap kulit berupa goresan, bekas suntikan, ataupun luka termis. Mikroba masuk ke tubuh, bereplikasi dan menginvasi jaringan lunak. Replikasi dan invasi ini berakibat aktivasi dari kaskade inflamasi manusia yang menyebabkan terbentuknya eritema, indurasi, dan pus yang menandakan terjadinya infeksi (Lynch, 2001).

2.2.5 Patologi

Aspek klinis Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* diringkas dalam gambar 2.3. MRSA telah menjadi isu kesehatan yang serius. Mayoritas infeksi yang diakibatkan MRSA bermanifestasi sebagai SSTI (*Skin and Soft Tissue Infection*) termasuk infeksi kulit pyogenic. Sebagian besar pasien MRSA merupakan pasien tanpa faktor resiko apapun (Yamamoto *et al.*, 2010)



Gambar 2.3 Manifestasi Klinis Infeksi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (Yamamoto *et al.*, 2010)

2.2.6 Epidemiologi

Frekuensi infeksi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* terus meningkat kejadiannya di rumah sakit secara global. Peningkatan insiden infeksi ini berkaitan dengan meningkatnya komplikasi penyakit pada pasien dan kemampuan patogen untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan. Masalah utama pada meningkatnya kejadian infeksi MRSA di pasien adalah tidak adanya faktor resiko khusus (Boucher *and* Corey, 2008).

Epidemiologi MRSA berubah secara konstan dan resistensinya terhadap antibiotik bervariasi berdasarkan wilayah atau Negara. Penanganan infeksi yang tepat, berdasarkan patogen lokal, diketahui memberikan hasil yang lebih baik bagi pasien (Mejia *et al.*, 2010). Sejak pertama kali ditemukan MRSA pada tahun 1960, MRSA menjadi agen penyebab infeksi nosokomial di rumah sakit secara global (Champion *et al.*, 2014).

2.2.7 Diagnosis Laboratorium

2.2.7.1 Bahan

Bahan isolat Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* berasal dari kultur MRSA yang diambil dari usapan hidung, axilla, dan inguinal dari pasien (Champion *et al.*, 2014).

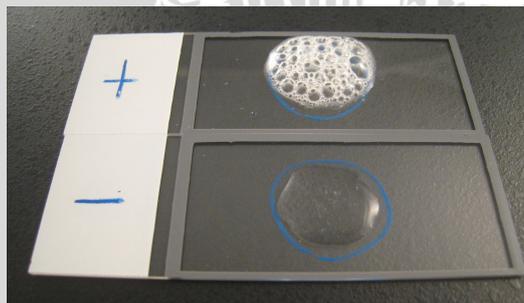
2.2.7.2 Biakan

Strain bakteri MRSA yang telah dilakukan tes resistensi oxacillin dikultur secara aerob pada suhu 37°C pada *blood agar plate* selama 24 jam sebelum dilakukan pengujian (Stenholm *et al.*, 2009). Pada umumnya staphylococcus pada tumbuh pada medium-medium yang biasa di pakai di laboratorium bakteriologi seperti *Nutrient Agar Plate* dan *Blood Agar Plate*. NAP penting untuk mengetahui adanya pembentukan pigmen dan *Staphylococcus aureus* akan

membentuk pigmen berwarna kuning emas. Koloni yang tumbuh berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, konvek dengan tepi rata, permukaan mengkilat, dan konsistensinya lunak. Penggunaan BAP menghasilkan koloni yang tampak lebih besar dari pada galur yang ganas biasanya memberikan hemolisa yang jernih di sekitar koloni (Todar, 2008)

2.2.7.3 Tes Katalase

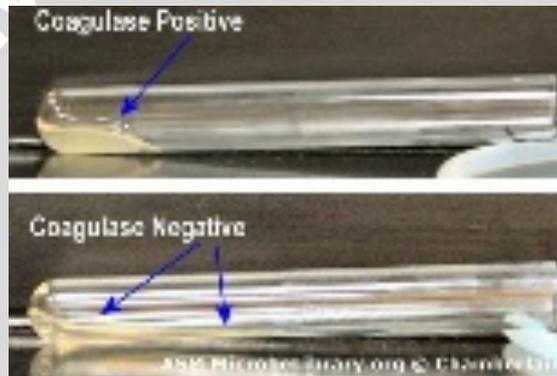
Uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Kebanyakan bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Enzim katalase diduga penting untuk pertumbuhan aerobik karena H_2O_2 yang dibentuk dengan pertolongan berbagai enzim pernafasan bersifat racun terhadap sel mikroba. Beberapa bakteri yang termasuk katalase negative adalah *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, dan *Clostridium*. Bakteri katalase positif seperti *Staphylococcus aureus* bisa menghasilkan gelembung-gelembung oksigen karena adanya pemecahan H_2O_2 dan bakteri katalase negative tidak menghasilkan gelembung-gelembung (Effendi *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Hasil Tes Katalase Positif dan Negatif (Pradhan, 2013)

2.2.7.4 Tes Koagulase

ada dua cara tes koagulase yaitu metode *slide test* dan *tube test*. Pada *slide test* yang dicari adalah bound coagulase atau clumping factor. Cara ini tidak dianjurkan untuk pemeriksaan rutin, karena banyak faktor yang dapat mempengaruhinya, antara lain diperlukan plasma manusia yang masih segar. Pada *tube test* yang dicari adalah adanya koagulase bebas dan cukup digunakan plasma kelinci. Hasilnya positif kuat jika tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Effendi *et al.*, 2013)



Gambar 2.5 Hasil Tes Koagulase Positif dan Negatif Menggunakan Metode *Tube Test* (Chamberlain, 2009)

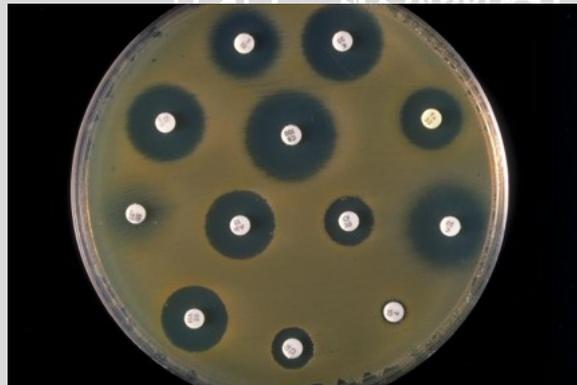
2.2.7.5 Tes Kepekaan Antibiotik

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mempelajari tentang pola resistensi antimikroba dari Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* dan ditemukan bahwa organisme ini resisten terhadap antibiotik beta laktam, aminoglikosida, dan makrolida. Resistensi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik dimediasi oleh plasmid yang mengandung enzim beta laktamase. Daya resistensi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* terbukti meningkat di berbagai rumah sakit di Amerika Serikat dari 17% menjadi 90%. Penggunaan terapi antibiotik menyebabkan strain bakteri sensitif akan terhambat

pertumbuhannya, sedangkan strain bakteri resisten akan bertahan dan menyebabkan infeksi kronis (Shakibaie *et al.*, 1999)

Metode lempeng difusi oleh *Kirby and Bauer* menjadi standart pemeriksaan sensitifitas terhadap antibiotik. Alternatif pemeriksaan yang lain adalah dengan menggunakan metode *broth microdilution testing*. Jika tidak terjadi pertumbuhan koloni bakteri di sekitar antibiotik maka diambil kesimpulan bakteri tersebut sensitif terhadap antibiotik yang diberikan (Hudzicki, 2009).

Tes identifikasi bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* secara spesifik menggunakan cakram antibiotic sefoksitin 30 mg. Bakteri ini ditanam merata pada permukaan media agar *Mueller Hinton* lalu diinkubasi 35°C. Sensitivitas atau resistensi koloni kuman di sekitar *disc* atau cakram antibiotik. Interpretasinya ialah diameter kurang dari atau sama dengan 19 mm disebut resisten dan lebih dari atau sama dengan 20 mm disebut sensitive (Jain *et al.*, 2008)



Gambar 2.6 Tes Kepekaan Antibiotik dengan Metode Lempeng Difusi (Todar, 2008)

2.3 Biofilm

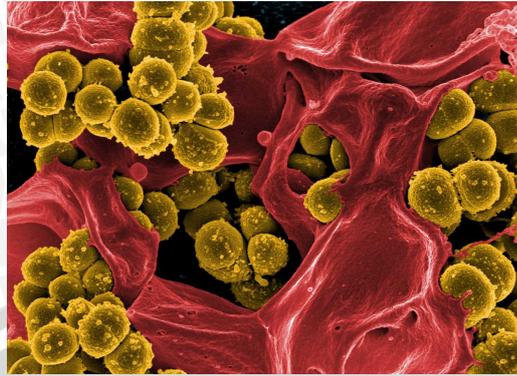
Biofilm biasa didefinisikan sebaga komunitas mikroba dengan suatu permukaan yang dikelilingi oleh matriks *extracellular polymeric substance* (EPS). Pembentukan biofilm merupakan strategi pertahanan mikroba patogen (Hall-

Stoodley *and* Stoodley, 2009). Pembatasan oksigen di dalam matriks biofilm menyebabkan perubahan kecepatan metabolisme dari organisme yang menempel pada suatu permukaan dikombinasi dengan fungsi matriks sebagai penghalang fisik sehingga mikroba menjadi resisten dari pertahanan tubuh inang senyawa antibiotik dan surfaktan (Lopez *et al.*, 2010).

2.3.1 Definisi Biofilm

Biofilm merupakan bakteri yang menempel pada suatu permukaan dan dibungkus dalam matriks glikokaliks polisakarida yang memediasi perlekatan (Costerton *et al.*, 1978). Biofilm dapat berupa sel-sel tunggal dan mikrokoloni yang berada dalam matriks (Costerton *et al.*, 1987). Perlekatan pada permukaan menjadi pemicu ekspresi gen pengontrol produksi komponen bakteri yang diperlukan dalam pembentukan biofilm (Costerton *et al.*, 1995).

Definisi biofilm harus menyertakan kemampuan sel untuk melekatkan diri pada suatu permukaan, pelapisan ekstrapolimer, komponen abiotik dan non-selular di dalam matriks, dan atribut fisiologis mikroba. Kesimpulannya, biofilm merupakan komunitas yang terdiri dari mikroba-mikroba yang menempel pada suatu permukaan dan antar mikroba, dilindungi di dalam matriks polimer ekstraselular. Biofilm ini mampu membentuk koloni pada alat-alat medis dan cairan tubuh yang tersirkulasi dengan kemampuan bertahan satu sama lain (Donlan *et al.*, 2002)



Gambar 2.7 Bentuk biofilm Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* dengan Mikroskop Elektron (Prostak *et al.*, 2013)

2.3.2 Struktur Biofilm

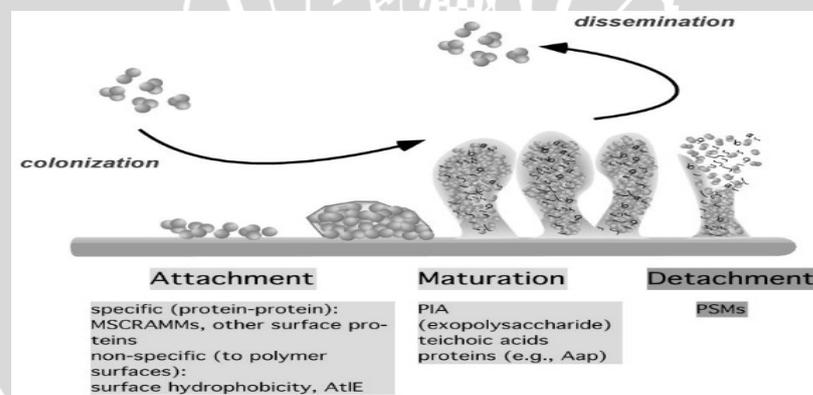
Biofilm lapisan tunggal secara umum menunjukkan kumpulan homogen dari sel-sel yang melekat di permukaan, tanpa membentuk kelompok bakteri yang nyata dan EPS (*Extracellular Polymer Substance*). Sebaliknya, biofilm lapisan banyak ditandai dengan kumpulan sel heterogen yang lebih kompleks dan adanya EPS (Karatan *and* Watnick, 2009). Dua perbedaan struktur mikroskopik dari biofilm berlapis yaitu struktur biofilm yang padat, seragam, dan datar dan struktur multi selular seperti bentuk jamur tiga dimensi (Fredheim *et al.*, 2009). Biofilm adalah lapisan yang terbentuk oleh koloni sel-sel mikroba dan melekat pada permukaan substrat, berada dalam keadaan diam, mempunyai karakteristik berlendir, dan tidak mudah terlepas dari permukaan (Madigan *et al.*, 1997).

2.3.3 Pembentukan Biofilm

Biofilm bakteri terbentuk sebagai hasil dari koordinasi kompleks interaksi antar mikroorganisme dengan suatu permukaan. Tahapan pembentukan biofilm secara umum adalah *initial attachment* ke permukaan, pembentukan lapisan tunggal, pembentukan mikro koloni, maturasi biofilm, dan pembentukan struktur

tiga dimensi. Struktur permukaan bakteri (flagella, vili, dan proyeksi permukaan) berpartisipasi pada pembentukan biofilm dan berkontribusi pada motilitas bakteri yang penting saat pembentukan biofilm (Smirnova *et al.*, 2010).

Pembentukan biofilm secara *in vitro* melalui 5 tahap. Tahap pertama, perlekatan *reversible* sel bakteri ke permukaan. Tahap kedua merupakan perlekatan *irreversible* yang dimediasi pembentukan material eksopolimer. Tahap ketiga adalah pembentukan mikrokoloni dan awal dari maturasi biofilm. Tahap keempat merupakan pembentukan biofilm yang matur dengan struktur tiga dimensi yang memiliki kanal sehingga memudahkan transport air dan nutrisi serta pembuangan sisa metabolisme. Tahap kelima merupakan pelepasan dan disperse sel dari biofilm serta merupakan awal pembentukan biofilm yang baru (Annous *et al.*, 2009)



Gambar 2.8 Fase Perkembangan Biofilm pada Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* dimulai dari perlekatan, maturasi, dan pelepasan (Otto, 2008)

Deskripsi Gambar: Pembentukan Biofilm diawali proses *Attachment* yaitu perlekatan mikroba dengan permukaan dibantu beberapa protein spesifik, MSCRAMMs, dan protein non spesifik. Kemudian proses maturasi dimana mikroba membentuk lapisan *exopolysaccharide* dan diakhiri proses pelepasan.

2.3.3.1 Perlekatan

Adhesi adalah kunci pembentukan biofilm. Kontak awal dengan bakteri dengan permukaan padat tidak menentukan perlekatan akhir. Awalnya perlekatan bersifat *reversible*, tahapan perlekatan merupakan interaksi fisikokimia yang kompleks. Adhesin yang terlibat dalam menangkal kekuatan tolakan antara permukaan yang bermuatan sama berkontribusi dalam transisi ke tahap *irreversible* pembentukan biofilm (Smirnova *et al.*, 2010)

Pada tubuh manusia, perlekatan dengan protein matriks merupakan gambaran langkah awal pembentukan biofilm. Perlekatan primer dimediasi oleh bahan-bahan permukaan sel baik kimiawi maupun fisik seperti halnya faktor spesifik yang memediasi perlekatan ke komponen matriks ekstraselular inang yang kemudian dengan cepat melapisi biomaterial segera setelah masuk ke tubuh inang. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* mengekspresikan MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) yang mempunyai kemampuan untuk mengikat protein matriks manusia seperti fibrinogen atau fibronektin (Merino *et al.* 2009).

2.3.3.2 Dispersi

Keberadaan biofilm merupakan suatu keuntungan bagi mikroorganisme yang ada di dalamnya. Biofilm juga bertambah dari segi ukuran sehingga sel-sel yang terletak di sisi paling dalam lapisan biofilm ada kemungkinan tidak mendapatkan akses nutrisi dan terakumulasi produksi toksik, oleh karena itu, lingkungan tersebut bisa tidak kondusif lagi. Akibat hal tersebut, bakteri mampu mendeteksi dan merespon kondisi lingkungan yang tidak kondusif dengan berubah kembali menjadi bakteri plankton (Karatan *and* Watnick, 2009).

2.3.4 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Biofilm

Pertumbuhan biofilm dipengaruhi oleh beberapa hal seperti: nutrisi, temperatur, kondisi permukaan, kecepatan, turbulensi, hidrodinamik, pengaturan gen, dan *Quorum Sensing* (Momba and Binda, 2002). Biofilm dapat terbentuk di berbagai konsentrasi nutrisi, mulai konsentrasi tinggi sampai konsentrasi yang tidak terdeteksi (Praskash *et al.*, 2003). Namun tetap saja biofilm dapat terbentuk dengan kuat pada konsentrasi nutrisi tinggi (Allison *et al.*, 2000). Temperatur optimal pada pertumbuhan bakteri adalah 40°C. Perubahan suhu sekecil apapun dapat mempengaruhi pembentukan biofilm (Timothy and Hansen, 2006).

2.3.5 *Quorum Sensing* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Pembentukan biofilm dan quorum sensing merupakan proses yang saling berkaitan. Pembentukan biofilm merupakan perilaku kelompok bakteri yang hidup dan mampu membentuk matriks ekstraselular. Quorum sensing merupakan mekanisme komunikasi antar sel yang menyinkronkan ekspresi gen. quorum sensing mampu mengoordinasikan perubahan gaya hidup biofilm ketika densitasnya mencapai ambang maksimal (Solano *et al.*, 2014).

Ekspresi gen bakteri pada beberapa spesies bakteri dapat diatur dengan quorum sensing, sistem sinyal yang dimediasi oleh molekul *autoinducer* kimia yang diproduksi oleh bakteri. Molekul-molekul *autoinducer* mengikat regulator transkripsi yang tepat ketika populasi bakteri mencapai tingkat quorum. Pengikatan *autoinducer* diikuti dengan aktivasi atau represi gen target. Dengan demikian, quorum sensing memungkinkan bakteri untuk menampilkan respon yang menguntungkan bagi populasinya. Sistem quorum sensing bakteri

meningkatkan akses ke nutrisi dan lingkungan serta meningkatkan kemampuan bersaing dengan bakteri lain atau tekanan lingkungan (Annous *et al.*, 2009)

2.3.6 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis

Mikroorganisme melekat ke permukaan dan memproduksi polisakarida ekstraselular secara universal yang menghasilkan terbentuknya biofilm. Biofilm merupakan masalah yang serius karena meningkatkan resistensi organisme terhadap antimikroba dan potensial untuk mengakibatkan infeksi pada pasien dengan alat medis (Donlan, 2001). Biofilm pada alat medis dapat terdiri dari bakteri gram positif, gram negatif, atau jamur. Organisme-organisme ini dapat berasal dari kulit pasien atau tenaga kesehatan, air keran yang merupakan jalan masuk keterpaparan, atau sumber paparan lainnya (Stickler, 1996).

Indwelling medical device	Organisms
Central venous catheter	Coagulase-negative staphylococci, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>
Prosthetic heart valve	Viridans <i>Streptococcus</i> , coagulase-negative staphylococci, enterococci, <i>Staphylococcus aureus</i>
Urinary catheter	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
Artificial hip prosthesis	Coagulase-negative staphylococci, β -hemolytic streptococci, enterococci, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Bacterioides</i> species, <i>Staphylococcus aureus</i> , viridans <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Artificial voice prosthesis	<i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Stomatococcus mucilaginosus</i>
Intrauterine device	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> species, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus</i> species, <i>Lactobacillus plantarum</i> , group B streptococci, <i>Enterococcus</i> species, <i>Candida albicans</i>

Gambar 2.9 Mikrorganisme terkait biofilm yang sering diisolasi dari alat medis (Donlan, 2001)

2.3.7 Resistensi Bakteri terhadap Antibiotik

Ketika bakteri tumbuh sebagai biofilm, bakteri tersebut menjadi 10-100 kali lebih resisten dibandingkan dengan bentuk bebasnya (Aaron *et al.*, 2002).

Biofilm bakteri dapat menyebabkan infeksi kronik karena meningkatnya toleransi terhadap antibiotik dan bahan kimia disinfektan yang dapat menghindari fagositosis dan komponen lain yang terkait sistem pertahanan tubuh. Pertumbuhan biofilm terkait dengan meningkatnya mutasi sejalan dengan mekanisme regulasi quorum sensing (Hoiby *et al.*, 2011). Resistensi terhadap senyawa beta lactam seperti methicillin dan oxacillin kebanyakan juga akan resisten terhadap antibiotik penicillin dan sefalosporin. Methicillin-resistant sebagian besar dimediasi oleh gen *mecA* yang mengkode Penicillin Binding Protein 2a (PBP2a) dengan afinitas rendah pada semua jenis beta lactam (Haddadin *et al.*, 2002).

2.3.8 Uji Pembentukan Biofilm

Biofilm merupakan sekelompok mikroorganisme yang dibungkus suatu lapisan eksopolimer. Biofilm sering dikaitkan dengan terjadinya berbagai infeksi yang kurang merespon antibiotik. Keberadaan biofilm pada Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* dapat dideteksi dengan menggunakan metode Congo Red Agar (CRA), metode tabung, dan metode Tissue Culture Plate (TCP) (Bose *et al.*, 2009).

2.3.8.1 Metode Congo Red Agar

Sebuah metode alternatif untuk *screening* pembentukan biofilm oleh isolat Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* menggunakan Congo Red Agar. Metode ini membutuhkan media yang solid yang terdiri dari *brain heart infusion broth* (BHI) dan ditambahkan sukrosa 5% dan Congo red stain (0,8 g/L). Plate ini kemudian diinokulasi dan diinkubasi secara aerob selama 24 sampai 48 jam

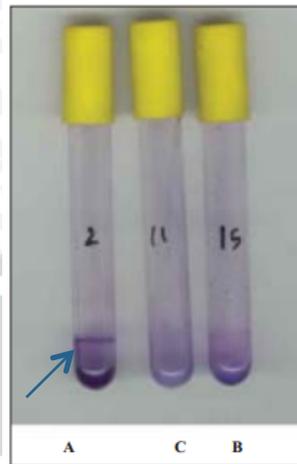
pada suhu 37°C (Mathur *et al.*, 2006). Koloni berwarna hitam dengan konsistensi *dry crystalline* mengindikasikan produksi biofilm (Bose *et al.*, 2009)



Gambar 2.10 Hasil Screening Pembentukan Biofilm Positif pada gambar Congo Red Agar A Ditandai dengan Terbentuknya Koloni Hitam (Mathur *et al.*, 2006)

2.3.8.2 Metode Tabung

Metode ini merupakan salah satu metode kualitatif untuk mendeteksi adanya biofilm. Organisme diinokulasi di *trypticase soy broth with glucose* (TSBglu) sebanyak 10ml di dalam tabung reaksi. Tabung tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian tabung dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan pH 7,3 dan dikeringkan. Lalu tabung dicat dengan crystal violet (0,1%), cat sisa dicuci dengan deionized water. Tabung dikeringkan dengan posisi terbalik. Hasil positif terbentuk biofilm didapatkan jika ada garis pada dinding dan dasar tabung (Hassan *et al.*, 2011).



Gambar 2.11 Hasil Pembentukan cincin Biofilm Positif Dapat Dilihat pada Tabung A, pada tanda panah cincin berwarna ungu (Mathur et al., 2006).

2.3.8.3 Metode *Tissue Culture Plate*

Metode ini merupakan suatu metode kuantitatif yang dianggap sebagai *gold-standard* pada deteksi biofilm. Organisme diisolasi dan diinokulasi pada TSBglu 10 ml. kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur diencerkan 1:100 dengan media segar. Kemudian kultur yang sudah diencerkan, diambil sebanyak 200 µL dan dimasukkan ke dalam *sterile 96 well-flat bottom polystyrene tissue culture. Plates* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, konten dipindahkan dengan *tapping* halus. *Wells* dicuci dengan 0,2 mL PBS (pH 7,2) sebanyak empat kali untuk memindahkan bakteri bebas. Biofilm yang terbentuk dengan perlekatan bakteri ke *wells* difiksasi menggunakan larutan *sodium acetate* 2% dan dicat dengan *crystal violet* 0,1%. Kelebihan cat dibersihkan menggunakan *deionized water* dan dikeringkan. *Optical Density* dari biofilm yang tercatat dianalisa menggunakan *micro ELISA autoreader* dengan panjang gelombang 570 nm (Hassan et al., 2011).

2.4 Teh Hitam

2.4.1 Klasifikasi Teh

Teh dapat dikelompokkan menjadi tiga jenis berdasarkan pengolahannya yaitu: teh hijau (tanpa fermentasi), teh oolong (difermentasi sebagian), dan teh hitam (fermentasi sepenuhnya). Pengolahan teh yang berbeda inilah yang menyebabkan perbedaan kandungan katekin (Alamsyah, 2006).

2.4.1.1 Teh Hijau

Diantara jenis teh yang lain, teh hijau merupakan jenis yang banyak diteliti dalam bidang kesehatan manusia (Cabrera *et al.*, 2006). Teh hijau pertama diekspor dari India ke Jepang pada abad ke-17. Saat ini diperkirakan sekitar 2,5 juta ton daun teh diproduksi tiap tahun di seluruh dunia dan 20% diproduksi sebagai teh hijau. Untuk memproduksi teh hijau, daun yang dipetik segar segera diuapi untuk mencegah fermentasi dan menghasilkan produk yang kering dan stabil. Proses penguapan ini bertujuan untuk menghancurkan enzim yang mampu memecah pigmen warna pada daun dan mempertahankan warna hijau dari daun teh selama proses penggulungan dan pengeringan. Proses-proses ini mempertahankan polifenol alami yang berguna untuk kesehatan (Chacko *et al.*, 2010).

2.4.1.2 Teh Oolong

Teh oolong didefinisikan sebagai teh dengan level oksidasi enzim tingkat sedang selama proses pengolahannya. Teh oolong memperlihatkan aktifitas antimutagenik yang lebih kuat dibandingkan teh hijau atau teh hitam.

Bagaimanapun, katekin bukan zat yang diunggulkan dalam teh oolong dalam fungsinya sebagai antigenotoksis (Su *et al.*, 2007).

2.4.1.3 Teh Hitam

Teh hitam termasuk salah satu jenis teh yang difermentasi secara sempurna sehingga menghasilkan warna yang hitam (Wan *et al.*, 2009). Sekitar 80% daun teh dari seluruh dunia diproduksi menjadi teh oolong dan teh hitam. Banyak sekali tipe teh hitam, sebagian besar diberi nama sesuai daerah asal. Assamica adalah salah satunya. Tipe teh ini berasal dari India dan menimbulkan aroma yang kuat. Bila pada teh hijau kandungan katekin mencapai 90% dan pada teh hitam hanya sekitar 15%, namun teh hitam masih merupakan sumber polifenol yang berharga. Sebagian besar polifenolnya merupakan *oxytheotannins* yang dapat ditemukan dalam bentuk *theaflavins* dan *thearubigins*. Satu cangkir teh hitam rata-rata mengandung kurang lebih 260 mg polifenol dan sebanyak 220 mg dari polifenol tersebut merupakan *theaflavins* dan *thearubigins* (Skotnicka *et al.*, 2011). Secara umum, kandungan *theaflavin* pada teh hitam berkontribusi terhadap rasa menyegarkan dan menenangkan pada teh hitam, sedangkan *thearubigin* berkontribusi terhadap kekuatan dan warna teh itu sendiri (Heiss and Heiss, 2007).

2.4.2 Morfologi Teh

Tanaman teh berbentuk seperti pohon yang memiliki ujung ranting dan daun uda yang halus. Tanaman ini tumbuh pada ketinggian 200 hingga 2.300 meter di atas permukaan laut (Alamsyah, 2006). Daun teh berbentuk elips

panjang, tunggal, pangkal runcing, dan bergerigi dengan ukuran 6-18 cm x 2-6 cm (Khairunisa, 2011).

Teh memiliki bunga berkelopak 5-6 buah. Mahkota daun dilekati oleh benang sari dalam bentuk melingkar. Biji teh sendiri mengandung minyak dan saponin (Khairunisa, 2011).



Gambar 2.12 Tanaman Teh (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) (Eliya, 2006)

2.4.3 Taksonomi Teh Hitam

Tanaman teh merupakan tanaman subtropics yang dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledoneae*

Sub kelas : *Dialypetalae*

Ordo : *Guttiferales (Clusiales)*

Famili : *Camelliaceae (Theaceae)*

Genus : *Camellia*

Species : *Camelliasinensis* (Tuminah, 2004)

2.4.4 Kandungan Kimia

Daun teh yang merupakan bahan utama pembuatan semua jenis teh mengandung beberapa komponen yaitu: bahan anorganik (Al, Mn, P, Ca, Mg, Fe, Se, Cu, dan K), senyawa yang mengandung nitrogen (protein, alkaloid, kafein, dan asam amino), karbohidrat, polifenol (katekin, tanin, *theaflavin*, *thearubigin*), pigmen (klorofil, anthosianin, dan flavon), enzim (polifenol oksidase, peroksidase, dan pectinase), dan vitamin (C dan E). Proses pengolahan yang berbeda dalam hal ini fermentasi mengakibatkan perbedaan komponen yang terkandung pada masing-masing jenis teh. Komponen bioaktif yang terkandung dalam teh sendiri terdiri dari flavonoid yang sebagian besar merupakan katekin, alkaloid, saponin, asam organik, dan pigmen. Alkaloid yang ada pada teh seperti kafein, *theobromin*, dan *theofilin* besarnya sekitar 3-4% (Wong *et al.*, 2009).

Compound	Green tea (µg/ml)	Black tea (µg/ml)
catechin (C)	21	20
(-)-epicatechin (EC)	98	37
(-)-epicatechin-3-gallate (ECG)	90	73
(-)-epigallocatechin (EGC)	411	42
(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	444	128
Total catechins	1064	300
<i>theaflavin</i> (TF1)	0	22
<i>theaflavin</i> -3-gallate (TF2a)	0	20
<i>theaflavin</i> -3'-gallate (TF2b)	0	13
<i>theaflavin</i> -3,3'-digallate (TF3)	0	9
Total <i>theaflavins</i>	0	64

Gambar 2.13 Perbedaan Kandungan Kimia yang Terdapat pada Teh Hijau Dan Teh Hitam (Skotnicka, 2011)

2.4.5 Komponen Bioaktif

Polifenol yang ada pada tanaman biasanya berupa asam fenolat, flavonoid, dan tanin (Astawan, 2008). Flavonoid juga terbagi dalam enam

kelompok yaitu flavonol, flavon, flavanol, isoflavon, flavanon, dan anthosianin (Wrasiati *et al.*, 2011). Pada teh, jenis flavonoid yang banyak dijumpai adalah flavanol dan flavonol. Flavonoid yang terkandung dalam teh berupa katekin. Katekin sendiri merupakan kelompok flavanol. Katekin pada teh didominasi oleh *epicatechin* (EC), *epicatechin gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) (Hartoyo, 2003).

Katekin mudah terurai bila terkena oksigen, cahaya, atau panas (Chen *et al.*, 2001). Flavonol yang merupakan salah satu jenis flavonoid juga terkandung dalam teh dengan total lebih sedikit dibandingkan flavanol. Flavonol tidak terpengaruh oleh enzim polifenol oksidase (Miean *and* Mohamed, 2001).

Tannin termasuk golongan fenol yang mampu larut dalam air dan dapat mengikat alkaloid, protein, dan gelatin (Adisewodjo, 1964). Berdasarkan sifat kimianya, tannin dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu tannin terkondensasi dan tannin terhidrolisis. Tannin terkondensasi adalah hasil dari kondensasi flavonol, sedangkan tannin terhidrolisis dapat membentuk asam galat, asam elegat, dan lain-lain (Hagerman, 2002). Jika tannin dilarutkan dalam air akan membentuk koloid dan saat airnya diuapkan residu yang terkumpul berupa bubuk merah kecokelatan (Hedqvist, 2004).

2.4.6 Khasiat Teh Hitam

2.4.6.1 Teh Hitam sebagai Penghambat Aterosklerosis

Teh hitam adalah salah satu penghasil flavonoid dan senyawa fenol lain yang memiliki manfaat sebagai antioksidan. Ekstrak teh hitam mampu mencegah oksidasi lipoprotein secara *in vivo* (Hodgson, 1999). Teh hitam juga mampu meningkatkan produksi Nitrooksida dan vasodilatasi sehingga menstimulasi

aktivitas *endothelial-nitrite oxide synthase* (eNOS), fosforilasi sel endotel, dan vasorelaksasi (Jochmann et al., 2008). *Theaflavin*, *thearubigin*, dan EGCG menrangsang eNOS pada endotel untuk memproduksi NO. *Thearubigin* menstimulasi vasodilatasi dan produksi NO dengan kuat dan efisien (Lorenz et al., 2009)

2.4.6.2 Teh Hitam sebagai Antibakteri

Katekin bermanfaat sebagai antibakteri karena memiliki gugus *pyrogallol* dan *galloil*. Racun dapat dihambat oleh struktur tersier gugus *catechol* dengan *galloil*. Selain itu pertumbuhan flora usus besar juga dapat dihambat dengan meningkatkan keasaman dalam tubuh (Alamsyah, 2006)

2.4.6.3 Teh Sebagai Perawatan Gigi

Teh memiliki kandungan fluoride yang berguna untuk memecah karang gigi dan menjaga kesehatan mulut. Teh mampu menghambat virus dalam rongga mulut dan bakteri pathogen yang dapat menimbulkan sakit pada gusi dan pembentukan karang gigi. Fluorida berfungsi juga sebagai penguat email gigi dan mencegah kerusakan gigi (Wiria, 2010).

2.4.6.4 Teh Sebagai Stimulator Neurologi

Tanin yang terdapat dalam teh hitam mampu menurunkan neurotransmitter serotonin, akibatnya terjadinya penurunan tekanan darah. Serotonin juga mempengaruhi mental dan emosi. Selain itu dopamin dapat memberikan perasaan senang dan memperbaiki suasana hati sehingga dapat menghilangkan stress, Gabungan dopamine dan serotonin sangat berkorelasi

dengan daya ingat, oleh karena itu konsumsi teh dapat meningkatkan daya ingat (Amiruddin, 2013).

2.4.7 Senyawa Penghambat Biofilm

2.4.7.1 Tanin

Tanin sebagai antibakteri akan mengganggu sintesis peptidoglikan sehingga dinding sel terbentuk tidak sempurna. Akibatnya sel bakteri akan lisis akibat tekanan osmotik ataupun fisik. Tanin juga mampu menginaktivasi adhesin pada bakteri yang digunakan untuk menempelkan dirinya pada inang yang ada pada permukaan sel (Naim, 2004). Jika tanin mampu mengikat protein sehingga tercipta ikatan hidrogen maka protein akan terendapkan dan terjadi denaturasi protein. Apabila denaturasi protein bakteri terjadi, enzim-enzim yang ada pada bakteri menjadi tidak aktif sehingga metabolisme bakteri terhambat yang memicu terjadinya kerusakan sel (Hagerman *et al.*, 1998). Akhirnya, tanin mampu menghambat pembentukan biofilm dengan merusak membran bakteri dan menghambat pembentukan matriks, menghasilkan kondisi bakteristatik (Trentin *et al.*, 2013)

2.4.7.2 Katekin

Katekin terbukti dapat menon-aktifkan protein dan mengacaukan bilayer lipid bakteri dengan mengubah morfologi membran (Shimamura *et al.*, 2007). Katekin memainkan peran penting dalam berbagai proses yang terkait dengan siklus sel seperti sinyal dan siklus sel, metabolisme asam arakidonat, apoptosis dan pemisahan sel. Katekin mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (Saadat *et al.*, 2013)

2.4.7.3 Saponin

Pembentukan biofilm dapat diganggu dengan produk alami, salah satunya adalah saponin yang menyebabkan sel lebih rentan terhadap tegangan osmotik (Coleman *et al.*, 2010). Saponin merupakan fitokimia aktif yang berpengaruh ke berbagai organisme (Bernards *et al.*, 2011).

2.4.7.4 Flavonoid

Struktur hidroksil yang terdapat pada flavonoid dan kompleks besarnya seperti tannin, mengendapkan protein melalui pembentukan ion, hidrofilik dan ikatan hidrogen dengan sekelompok protein. Hal ini menjelaskan mengapa pembentukan epitel atau endotel dengan lesi biofilm mampu diperkuat secara struktur (Bishop *and* Hamilton, 2009).