

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Burkholderia pseudomallei*

Burkholderia pseudomallei merupakan agen dari melioidosis, penyakit infeksi yang dapat menyerang manusia maupun hewan. Penyakit ini banyak terjadi pada daerah dengan iklim tropis, khususnya Asia Tenggara dan bagian Utara Australia. Bakteri ini dapat ditemukan pada air yang terkontaminasi dan tanah, terutama pada daerah pertanian yang menanam padi. Penyebaran penyakit terjadi melalui inhalasi, ingesti, dan kontak luka dari air atau tanah yang terkontaminasi (Brooks *et al.*, 2010).

2.1.1 Taksonomi *Burkholderia pseudomallei* (Sayers *et al.*, 2012)

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Betaproteobacteria
Order	: Burkholderiales
Family	: Burkholderiaceae
Genus	: <i>Burkholderia</i>
Species	: <i>Burkholderia pseudomallei</i>

2.1.2 Karakteristik Bakteri

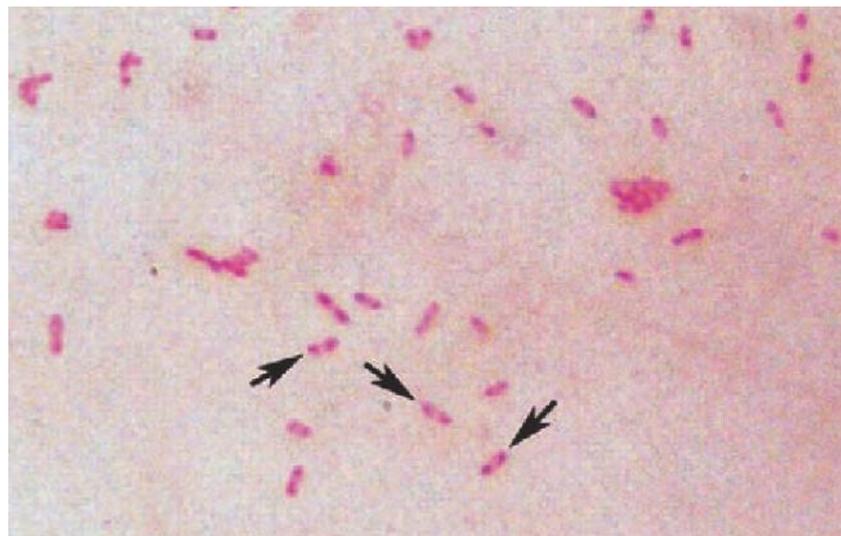
Burkholderia pseudomallei merupakan bakteri batang kecil Gram negatif, motil, dan berukuran 3-5 μm x 0,5-1 μm . Pada pewarnaan Gram atau pewarnaan sederhana, setelah dikultur selama 18-24 jam biasanya dapat terlihat gambaran

bipolar atau “*safety pin*” appearance. Bakteri dapat ditemukan secara tunggal, berpasangan, atau kadang membentuk rantai. Gambaran bipolar ini tidak selalu terlihat pada isolat klinis, sehingga diagnosis definitif bergantung pada isolasi dan identifikasi (Dance *et al.*, 1989). Walaupun bersifat aerob, *B. pseudomallei* dapat tumbuh secara anaerob pada media kompleks, dengan nitrat sebagai substrat respirasinya (Hamad *et al.*, 2011).

Bakteri mudah tumbuh pada medium sederhana dan dapat dikultur dengan media isolasi primer aerob untuk bakteri Gram negatif kecuali *salmonella-shigella* (SS) agar dan *deoxycholate-citrate* agar (DCA). Koloni pada agar nutrisi setelah 24 jam pada suhu 37°C terlihat kecil (diameter 0,5-1 mm), bulat, tidak berwarna, basah, dan sedikit konveks. Setelah 48 jam, koloni menjadi opak, berwarna krim kekuningan, dan berdiameter 2-3mm. Pada inkubasi lebih lanjut, koloni secara khas akan berubah menjadi kasar dan berkerut pada permukaannya. Pada *blood* agar setelah 24 jam koloni tidak berwarna, mengkilat, dan cembung, dengan area sekitar koloni berubah menjadi keabuan hingga kehijauan. Pada agar McConkey, koloni biasanya tidak berwarna, menunjukkan bahwa *B. pseudomallei* tidak memfermentasi laktosa. Perbenihan cair tampak keruh setelah 12-18 jam pada suhu 37°C. Terkadang terdapat ciri bau seperti tanah yang dikeluarkan oleh kultur (CABI, 2017).

Resistensi *Burkholderia* terhadap berbagai bahan pewarna yang seringkali membunuh bakteri membuatnya dapat dikultur pada media selektif untuk membedakannya dengan *Pseudomonas aeruginosa* (Pitt, 1990), salah satunya adalah Ashdown. Medium Ashdown mengandung gliserol sehingga menginduksi koloni untuk berkerut, kristal violet dan gentamisin (pada konsentrasi inhibisi terhadap bakteri lain termasuk *Proteus sp.*), dan *neutral red*

yang secara selektif diserap oleh *B. pseudomallei*, namun menghambat pertumbuhan sebagian besar bakteri lainnya. Pada medium ini, setelah 18-24 jam terlihat koloni kecil berwarna pink pucat, sedangkan pada 48 jam koloni menjadi berukuran 1-2 mm, pink keunguan, datar, dan kering dengan *sheen*. Setelah 72 jam, koloni berukuran 2-3 mm, berwarna lebih tua, lebih kering dan berkerut, walaupun tidak menutup kemungkinan adanya varian mukoid (Walsh dan Wuthiekanun, 1996). Koloni berwarna pink hingga keunguan, kering, berkerut, dan memiliki ciri hasil pewarnaan Gram yang telah disebutkan diatas, menjadi karakteristik identifikasi presumtif akan *B. pseudomallei* (Gilligan dan Whittier, 1999). Morfologi koloni ini menjadi karakteristik utama yang membedakan *B. pseudomallei* dengan patogen relatif lainnya seperti *B. mallei*, *B. cepacia*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri ini memiliki bau khas yang sama dengan *B. cepacia* dan motil (*B. mallei* tidak motil) (Walsh dan Wuthiekanun, 1996).



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Burkholderia pseudomallei* menunjukkan gambaran bipolar/ "safety pin" appearance (ditunjukkan melalui panah warna hitam) (Apisarnthanarak *et al.*, 2005)

2.1.3 Gambaran Klinis Melioidosis

Melioidosis memiliki spektrum penyakit yang luas sehingga sulit dibedakan dengan gejala penyakit lain seperti tuberkulosis atau pneumonia. Secara umum gejala dapat dibagi mejadi infeksi lokal, paru, *bloodstream*, dan *disseminated*. Infeksi lokal ditandai dengan nyeri dan bengkak, demam, ulserasi, dan abses. Infeksi paru ditandai dengan batuk, nyeri dada, demam tinggi, sakit kepala, dan anoreksia. Infeksi *bloodstream* ditandai dengan demam, sakit kepala, distres napas, nyeri abdomen, nyeri sendi, dan disorientasi. Infeksi yang *disseminated* mirip dengan infeksi *bloodstream*, tetapi dengan klinis yang lebih parah seperti kejang (CDC, 2017).

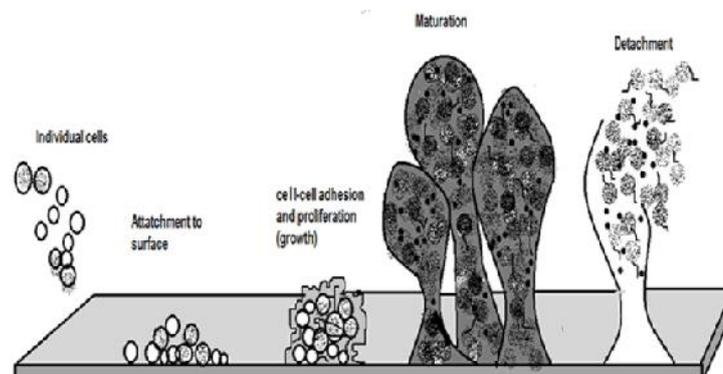
2.1.4 Patogenesis dan Faktor Virulensi

Masa inkubasi *B. pseudomallei* dipengaruhi oleh jumlah bakteri yang terinokulasi, cara transmisi, faktor resiko pejamu, dan jenis strain bakteri. Pada umumnya masa inkubasi adalah 1 hingga 21 hari (rata-rata 9 hari). Kebanyakan infeksi adalah asimtomatik. Faktor resiko pejamu seperti diabetes, penyakit ginjal, dan konsumsi alkohol berperan penting dalam menentukan keparahan penyakit. *B. pseudomallei* merupakan patogen fakultatif intraseluler yang dapat menginvasi dan bereplikasi di dalam berbagai jenis sel pada tubuh manusia, termasuk leukosit polimorfonuklear, makrofag, dan sel epitel. Resistensi terhadap serum manusia (yang diperankan oleh lipopolisakarida bakteri) dan kemampuan bakteri untuk bertahan secara intraseluler berperan kritis dalam patogenesis melioidosis. Sistem sekresi tipe III dan tipe IV juga berperan penting dalam invasi sel serta kemampuan bertahan di dalam sel. Quorum sensing dipercayai

berkontribusi dalam berbagai aspek virulensi *B. pseudomallei*, seperti invasi sel, sitotoksisitas, dan resistensi antimikroba. Faktor virulensi lain yang telah diketahui, yaitu flagela, pili tipe IV dan *adhesin*, siderofor, dan sekresi protein, seperti hemolisin, lipase, dan protease. *Burkholderia lethal factor-1* serupa dengan *Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1* yang menghambat inisiasi dari translasi protein sehingga merubah sitoskeleton aktin dan berakhir pada kematian sel (Cruz-Migoni *et al.*, 2011).

Pertahanan intraseluler *B. pseudomallei* dapat menjelaskan sifat infeksi yang laten. Setelah internalisasi, bakteri kabur dari vakuola endositik menuju sitoplasma dan mengaktifasi polimerisasi aktin, sehingga terjadi penyebaran antarsel. Faktor pertahanan lain meliputi *phenotypic switching* dengan cara perubahan morfologi koloni, yang kemudian mengakibatkan perubahan dalam ekspresi faktor virulensi seperti flagela dan biofilm (Chantratita *et al.*, 2007). Biofilm yang diproduksi *B. pseudomallei* berandil dalam patogenesis seluler terhadap sel epitel paru manusia, yakni perlekatan awal dan invasi, apoptosis, dan respon proinflamasi (Kunyaneer *et al.*, 2016).

2.1.5 Biofilm



Gambar 2.2 Fase-fase pembentukan biofilm (Jamal *et al.*, 2015)

Biofilm merupakan kumpulan dari sel mikroba yang secara *irreversible* terikat pada permukaan, serta ditutupi oleh matriks polisakarida. Susunan biofilm terbagi menjadi dua komponen utama, yaitu kanal air sebagai transpor nutrisi dan bagian yang padat tanpa pori. Biofilm bakteri pada umumnya tidak dapat ditembus oleh antimikroba maupun sistem imun. Biofilm dapat terbentuk di berbagai macam tempat baik alam bebas maupun tempat-tempat industri, hotel, saluran pipa, kamar mandi, dan rumah sakit dimana paling sering terbentuk pada permukaan keras yang terendam air. Pembentukan biofilm dapat terjadi baik di atas permukaan benda mati maupun jaringan hidup (Costerton *et al.*, 1999).

Biofilm terbentuk melalui proses yang kompleks, dimana sel planktonik (mikroba bebas) berubah menjadi bentuk *sessile* (melekat ke permukaan sebagai pembentuk biofilm). Terbentuknya biofilm diawali dengan pergerakan mikroba menuju permukaan objek. Mikroba lalu berinteraksi langsung dengan permukaan atau mikroba lain yang sudah menempel sebelumnya. Perlekatan ini dipicu oleh lingkungan berupa cairan serta tekstur permukaan keras, hidrofilik, dan sebelumnya telah terlapisi.

Mikroba yang telah menempel lalu mengeluarkan sinyal kimiawi dan bermultiplikasi. Sinyal kimiawi yang melebihi ambang batas akan menstimulasi produksi *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) sehingga terbentuk mikrokoloni (Mckenney *et al.*, 1995). Kemudian terjadi ekspresi gen pembentuk biofilm dan terjadilah maturasi. Setelah diteliti lebih lanjut, ditemukan bahwa sel mikroba secara rutin dikeluarkan dari biofilm setelah maturasi tersebut (Jamal *et al.*, 2015).

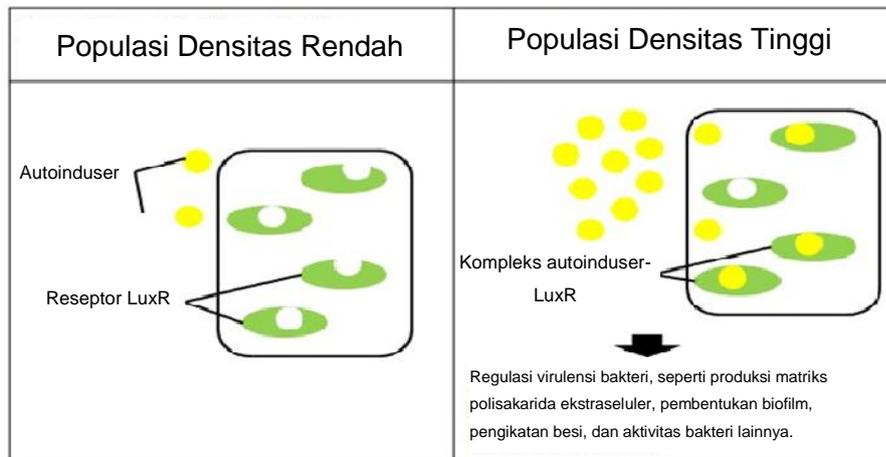
2.1.6 Biofilm *Burkholderia pseudomallei*

Pembentukan biofilm oleh *Burkholderia pseudomallei* pada jaringan manusia dan secara *in vitro* telah dibuktikan (Taweechaisupapong *et al.*, 2005; Vorachit *et al.*, 1995; Kamjumphol *et al.*, 2013, Ramli *et al.*, 2012). Pembentukan biofilm oleh spesies *Burkholderia*, dipicu oleh berbagai macam hal, seperti kondisi paru-paru yang berhubungan dengan penetrasi bakteri dan pertahanan intraseluler pada sel jaringan pejamu. Hal ini dapat memicu infeksi berat dan kegagalan terapi antibiotik pada pasien *cystic fibrosis* (Savoia dan Zucca, 2007).

Berbagai macam komponen *B. pseudomallei*, termasuk kapsul dan pili, dilaporkan turut berperan dalam adhesi pada sel pejamu (Essex-Lopresti *et al.*, 2005). Setelah perlekatan dengan sel pejamu, patogen masuk ke dalam sel melalui sistem *type 3 secretion* (T3SS) dan dua komponen regulator respon (Sun dan Gan, 2010). Hal ini memungkinkan patogen untuk bertahan hidup secara intraseluler dan menginduksi apoptosis sel (Kunyanee *et al.*, 2016).

2.1.7 *Quorum Sensing Burkholderia pseudomallei*

Burkholderia pseudomallei memiliki proses komunikasi antar sel bakteri ketika mereka berkembang di dalam jaringan pejamu. Proses komunikasi ini disebut dengan *quorum sensing* (QS). Pada proses ini terdapat reaksi silang sinyal molekul atau autoinduser yang dihasilkan oleh tiap sel bakteri yang terlibat dalam pembentukan biofilm. Pada bakteri Gram negatif dihasilkan autoinduser *N-acyl homoserine lactone* (AHL) yang diproduksi oleh golongan LuxI dari AHL sintase (Rasmussen *et al.*, 2006).



Gambar 2.3 Sistem *quorum sensing* (Ngeow *et al.*, 2013)

Quorum sensing memungkinkan terjadinya proses regulasi terhadap ekspresi gen secara kolektif, yang demikian mengatur aktivitas kumpulan bakteri dengan sifat tergantung pada densitas populasi. Aktivitas QS akan aktif bila populasi bakteri mencapai densitas yang tinggi. Hal ini disebabkan karena pada populasi densitas rendah, AHL sintase diekspresikan dengan konsentrasi rendah pula, sehingga AHL yang dihasilkan berdifusi melewati membran sel dan berada di luar sel. Saat densitas populasi meningkat dan produksi AHL mencapai ambang tertentu, AHL akan berdifusi kembali ke dalam sel dan berikatan dengan reseptor LuxR pada sel bakteri membentuk kompleks LuxR-AHL (Rasmussen *et al.*, 2006). Kompleks ini berfungsi sebagai regulator transkripsi gen-gen virulensi seperti produksi matriks polisakarida ekstraseluler, pembentukan biofilm, pengikatan besi, dan aktivitas bakteri lainnya (Ngeow *et al.*, 2013).

Sistem QS yang dianut oleh *Burkholderia pseudomallei* analog dengan QS bakteri Gram negatif lainnya hanya saja namanya berbeda. *B. pseudomallei* menganut sistem QS BpsI-BpsR, dimana BpsI adalah AHL sintase dan BpsR berperan sebagai regulator transkripsi gen. *B. pseudomallei* mengkode tiga AHL sintase (BpsI1, BpsI2, dan BpsI3) serta lima gen regulator. AHL yang paling

banyak dihasilkan adalah *N-octanoylohomoserine lactone* (C8HL) (Horton *et al.*, 2013).

2.2 Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.)

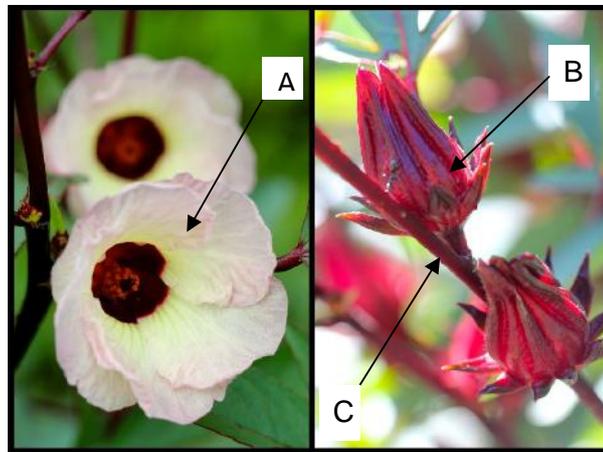
Hibiscus sabdariffa L. dalam bahasa Indonesia disebut Rosela. Rosela di daerah Sunda dikenal dengan nama *gamel walanda*, di Ternate dengan nama *katsuri rortha*, di Jawa Tengah dengan nama *mrambos hijau*, di Padang dengan nama *asam jarot*, di Sumatera Selatan dengan nama *kesew jawe*, dan di Muara Enim dengan nama *asam rejang* (Maryani dan Kristiana, 2008; Mardiah *et al.*, 2009).

2.2.1 Morfologi Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) merupakan salah satu anggota famili Malvaceae yang tumbuh dengan baik di daerah beriklim tropis dan subtropis. Tanaman ini merupakan tanaman semak dengan tinggi 3-5 m. Batang tanaman rosela berbentuk silindris dan berkayu, serta memiliki banyak percabangan. Pada batang melekat daun yang tersusun berseling, berwarna hijau, berbentuk bulat telur dengan pertulangan menjari dan tepi meringgit. Ujung daunnya ada yang runcing atau bercangap, panjang daun 6-15 cm, lebar daun 5-8 cm, dan akarnya merupakan akar tunggang (Widyanto dan Nelisty, 2008).

Tanaman rosela mempunyai bunga yang berwarna merah. Kelopak bunga atau kalikisnya berwarna merah gelap. Bunga rosela yang keluar dari ketiak daun merupakan bunga tunggal, artinya setiap tangkai hanya terdapat 1 bunga. Bunga ini mempunyai 8-11 helai kelopak yang berbulu, panjangnya 1 cm, dan pangkalnya saling berlekatan. Mahkota bunga rosela terdiri dari 5

helaian, berbentuk corong, panjangnya sekitar 3-5 cm, dan berwarna merah. Kedua bagian inilah yang sering dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bahan dasar pembuatan makanan dan minuman (Maryani dan Kristiana, 2005). Tangkai sari yang merupakan tempat melekatnya benang-benang sari berukuran pendek dan tebal, panjangnya sekitar 5 mm, dan lebar sekitar 5 mm. Putik berbentuk tabung, berwarna kuning atau merah (Mardiah dkk., 2009).



Gambar 2.4 Morfologi bunga rosela: (a) Mahkota bunga, (b) Kelopak bunga, (c) Tangkai bunga (diambil dari chestnutherbs.com)

2.2.2 Taksonomi Rosela (*Hibiscus sabdarifa* L.)

Menurut Mardiah dkk. (2009), kedudukan taksonomi tanaman rosela adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvaceales
Famili	: Malvaceae

Genus : *Hibiscus*

Spesies : *Hibiscus sabdariffa* L.

2.2.3 Khasiat Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.)

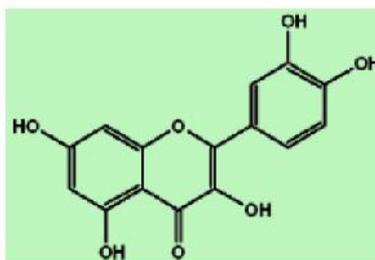
Rosela memiliki berbagai macam khasiat sehingga banyak diminati oleh masyarakat Indonesia. Menurut Dep.Kes RI No. 10.65/35.15/05, setiap 100 gr rosella mengandung 260-280 mg vitamin C, vitamin D, vitamin B1 dan vitamin B2. Kandungan lainnya yaitu kalsium 486 mg, omega 3, magnesium, beta karotin dan asam amino esensial, seperti lisin dan arginin (Oki, 2012).

Kelopak bunga rosela populer dikonsumsi di Indonesia karena khasiatnya yang banyak, antara lain sebagai antibakteri, antioksidan, nefroprotektif, hepatoprotektif, diuretik, antikolesterol, antidiabetik, dan antihipertensi (Rocha *et al.*, 2014).

2.2.4 Rosela sebagai Antibakteri

2.2.4.1 Quersetin

Quersetin termasuk dalam subkelas flavonol, kelas flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu kelas dari polifenol yang terdiri dari beberapa sub kelas seperti *flavone*, *flavonol*, *flavanonol*, *flavanon*, *flavan*, dan *anthocyanin* (Peterson dan Dwyer, 1998).



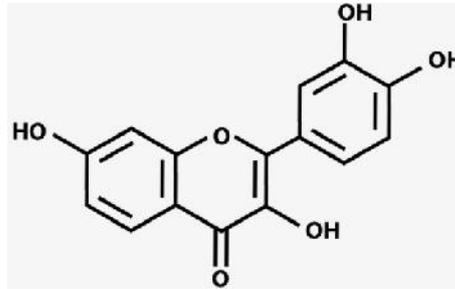
Gambar 2.5 Struktur molekuler quersetin (Moskuag *et al.*, 2004)

Quersetin diketahui memiliki aktivitas antibakteri dengan cara menghambat sintesis protein bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Ragunathan dan Ravi, 2015; Wonnicka *et al.*, 2013). Senyawa ini juga dapat bertindak sebagai agen antivirus karena aktivitasnya dalam menghambat polimerase dan berikatan dengan asam nukleat dan protein kapsid berbagai macam virus seperti HIV-1, HSV, RSV, poliovirus, dan virus Sindbis (Middleton, 1994; Selway, 1986). Quersetin mampu berikatan dengan DNA girase bakteri, sehingga replikasi DNA terhambat dan dapat meningkatkan permeabilitas membran bagian dalam pada bakteri serta derajat disipasi dari potensial membran. Karena gradien proton merupakan hal yang esensial dalam sintesis ATP, transpor membran, dan motilitas, efek quercetin inilah yang kemungkinan besar berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri dan penurunan resistensi bakteri terhadap antibiotik (Othemeng *et al.*, 1993; Mirzoeva *et al.*, 1997).

2.2.4.2 Tanin

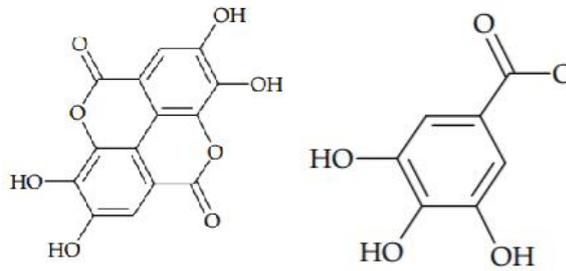
Tanin menurut struktur kimia dan sifatnya dibagi menjadi dua kelompok utama: tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis biasanya biasanya ditemukan dalam konsentrasi yang lebih rendah pada tanaman dibandingkan tanin terkondensasi. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA girase sehingga DNA sel tidak dapat terbentuk (Robinson, 1991). Secara garis besar tanin merusak membran sel bakteri, senyawa astringen tanin mampu menginduksi pembentukan senyawa kompleks terhadap enzim atau substrat mikroba dan

pembentukan suatu ikatan kompleks tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri (Akiyama *et al.*, 2001).



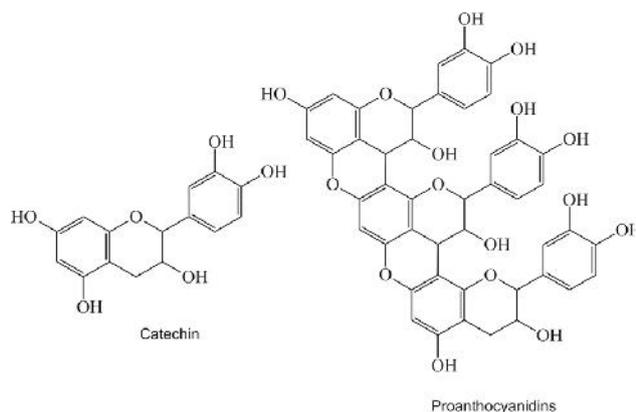
Gambar 2.6 Struktur inti tanin (Robinson, 1991)

Tanin terhidrolisis biasanya berikatan dengan karbohidrat dengan membentuk jembatan oksigen, maka dari itu tanin ini dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat atau asam klorida. Salah satu contoh jenis tanin ini adalah gallotanin yang merupakan senyawa gabungan dari karbohidrat dengan asam galat. Selain membentuk gallotanin, dua asam galat akan membentuk tanin terhidrolisis yang bisa disebut ellagitanin. Ellagitanin sederhana disebut juga ester asam *hexahydroxydiphenic* (HHDP). Senyawa ini dapat terpecah menjadi asam galat jika dilarutkan dalam air (Manitto, 1992). Ellagitanin dilaporkan mempunyai efek antibakteri terhadap *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dengan cara melisiskan dinding sel (Din *et al.*, 2013).



Gambar 2.7 Struktur molekuler tanin terhidrolisis: ellagitanin (kiri) dan asam galat (kanan) (Slobodníková *et al.*, 2016)

Tanin terkondensasi biasanya tidak dapat dihidrolisis, tetapi dapat terkondensasi menghasilkan asam klorida. Tanin jenis ini kebanyakan terdiri dari polimer flavonoid yang merupakan senyawa fenol. Nama lain dari tanin ini adalah proantosianidin. Proantosianidin merupakan polimer dari flavonoid yang dihubungkan melalui C8 dengan C4 (Manitto, 1992). Tanin terkondensasi mampu mengubah permeabilitas membran sel bakteri dengan cara berikatan dengan ion kalsium, yang kemudian mengganggu absorpsi dari *trace elements* yang penting dalam pertumbuhan bakteri (Hetal *et al.*, 2012).



Gambar 2.8 Struktur molekuler tanin terkondensasi: catekin dan proantosianidin (de Amorim *et al.*, 2012)

2.2.5 Rosela sebagai Antibiofilm

2.2.5.1 Quersetin

Quersetin bersama tanin adalah senyawa aktif terbanyak yang terdapat pada kelopak bunga rosela (Alaga *et al.*, 2014). Pada penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al.* (2013), quersetin dan tanin dari ekstrak *Alnus japonica* mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* hingga 80% pada konsentrasi 1 µg/mL dan 20 µg/mL, secara berurutan. Sementara pertumbuhan bakteri tidak terpengaruh pada konsentrasi quersetin 5 µg/mL dan tanin 20 µg/mL, dan sedikit berubah ketika konsentrasinya dinaikkan. Quersetin dapat menekan ekspresi gen-gen adhesi bakteri secara signifikan. Mekanisme ini yang akan mengganggu proses pembentukan biofilm karena menghambat pembentukan *polysaccharide intercellular adhesion* (Cushnie dan Lamb, 2011; Lee *et al.*, 2013). Percobaan mengenai penghambatan biofilm bakteri *S. aureus* oleh anggur merah (*Vitis vinifera*) menunjukkan bahwa quersetin adalah senyawa yang paling aktif (Cho *et al.*, 2015). Pada sistem quorum sensing, quersetin berperan sebagai inhibitor nonkompetitif pada reseptor regulator AHL. Hal ini akan mencegah terjadinya transkripsi gen-gen pembentuk biofilm (Packowzki *et al.*, 2017).

2.2.5.2 Tanin

Tanin dapat mencegah perlekatan awal terhadap permukaan serta sintesis komponen adhesi polisakarida interselular, yang merupakan struktur penting dalam pembentukan biofilm (Slobodníková *et al.*, 2016). Tanin juga mampu menghambat sistem quorum sensing dengan cara berikatan pada AHL sintase secara antagonis sehingga produksi sinyal autoinduser terhambat dan

mencegah terjadinya transkripsi gen-gen pembentuk biofilm. Mekanisme ini akan menghambat terjadinya maturasi biofilm (Chang *et al.*, 2014).