

BAB I

PENGANTAR

1.1. Latar Belakang

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan suatu keadaan berkembangnya mikroorganisme di saluran kemih dan terdapat mikroorganisme murni lebih dari 10^5 *Colony Forming Units* (CFU) di dalam urin (Sukandar, 2009). Infeksi Saluran Kemih (ISK) pada pasien disebabkan oleh kateterisasi urin. Semakin lama kateter terpasang, maka peluang kateter terkontaminasi oleh mikroba semakin besar. Hal ini disebabkan penggunaan kateter jadi jalur masuk mikroba ke dalam saluran kemih Mikroorganisme yang tersering menimbulkan ISK, yaitu *Staphylococcus*. *Staphylococcus* merupakan bakteri yang sangat virulen yang dapat menyebabkan infeksi, termasuk di saluran kemih terutama pada penderita dengan *indwelling catheters* (kateter menetap) (Inweregbu, 2005).

Infeksi saluran kemih yang disebabkan bakteri *Staphylococcus* terus meningkat dan penanganan ISK yang tidak tepat menyebabkan resistensi terhadap obat (Jalalpoor *et al.*, 2011). Perubahan pola resistensi bakteri penyebab ISK terjadi lebih cepat dibanding infeksi lainnya (Pranoto *et al.*, 2012). Charlebois *et al.*, (2004), melaporkan *Staphylococcus* resisten terhadap obat golongan penisilin dan turunannya seperti metisilin. Di India, *Staphylococcus* ditemukan angka resistensi tertinggi sebesar 77% (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Di Asia, infeksi *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) diperoleh sebesar 70%. Di Indonesia, prevalensi infeksi MRSA pada tahun 2006 ditemukan sebesar 23,5% (Sulistyaningsih, 2010).

Antibiotik yang digunakan terus menerus dapat meningkatkan jumlah mutasi ataupun rekombinasi struktur gen sel bakteri, sehingga bakteri membentuk generasi baru yang resisten (Lewis, 2001). Selain itu, antibiotik yang digunakan terus menerus dapat meningkatkan tekanan selektif proses evolusi dan poliferasi strain bakteri yang resisten. Bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik sangat sulit dieliminasi selama proses infeksi dan dapat menyebabkan kematian (Pratiwi, 2008).

Hoiby *et al.*, (2010), melaporkan salah satu faktor virulensi bakteri *Staphylococcus* yaitu resisten terhadap fagositosis dan sel imunokompeten. Bakteri dapat melekat pada kateter dan alat kesehatan lainnya dan membentuk biofilm. Biofilm merupakan kolonisasi mikroorganisme yang menempel pada permukaan substrat dan dilapisi matriks

ekstraselular yang tipis. Bakteri yang membentuk biofilm dapat bertahan terhadap lingkungan ekstrim yang membahayakan bakteri tersebut, sehingga bakteri menjadi lebih tahan terhadap antibiotik (Krzsciak *et al.*, 2014). Bakteri yang resisten terhadap antibiotik akan membentuk lapisan *Extracelullar Polyshacaride Matrix* (EPM) untuk melindungi diri dalam bentuk biofilm (Usha *et al.*, 2010).

Biofilm dianggap sebagai mediator utama infeksi terkait pembentukan biofilm sebesar 80% (Archer *et al.*, 2011). Biofilm mikroorganisme yang terbentuk dapat meningkatkan toleransi terhadap antimikroba dan disinfektan, sehingga biofilm berperan penting penyebab terjadinya resistensi dan penyakit kronis. Terapi antibiotik hanya akan membunuh sel-sel planktonik, sedangkan bakteri dalam bentuk biofilm akan tetap hidup. Hal ini dikarenakan antibiotik tidak dapat menembus lapisan biofilm bakteri (Mah and Toole, 2001).

Biofilm *Staphylococcus* juga terkait dengan peningkatan Infeksi Saluran Kemih (ISK) yang disebabkan penggunaan kateter pada pasien (Gad *et al.*, 2009). Biofilm bakteri yang terbentuk pada kateter dapat menyebabkan infeksi kronis yang sulit diobati, waktu rawat inap pasien lebih lama dan biaya pengobatan semakin lebih mahal (Mahami and Adu-Gyamfi, 2011). Insidensi ISK tiap negara memiliki data statistik yang berbeda, karena ISK dipengaruhi oleh tingkat kesehatan masyarakat dan pelayanan kesehatan di negara tersebut. Di Indonesia, insidensi dan prevalensinya ISK masih cukup tinggi. Hal ini disebabkan tingkat dan taraf kesehatan masyarakat yang masih jauh dari standar dan tingkat kehidupan sosial ekonomi tidak merata, sehingga kejadian ISK di Indonesia masih tinggi (Muthia *et al.*, 2014).

Biofilm *Staphylococcus* terbentuk dengan dua cara, yaitu perlekatan antar sel dan perlekatan pada permukaan inang (Hoiby *et al.*, 2011). Pelekatan antar sel diregulasi salah satunya melalui ekspresi operon *intercellular adhesion (ica)*. Gen *ica* akan menyandi *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA) *Staphylococcus* (Arciola *et al.*, 2001). Selain itu, PIA berperan penting dalam pembentukan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) dan agregasi sel bakteri.

Biofilm *Staphylococcus* yang terbentuk dapat menyebabkan sulitnya mengendalikan penyakit. Mikroorganisme dalam bentuk biofilm dapat menghindari sistem pertahanan inang dan lebih resisten terhadap antibiotik sebesar 10 sampai dengan 10.000 kali dibanding mikroorganisme dalam bentuk sel planktonik (Monroe, 2007). Antibiotik yang tidak dapat menetrasi sel *Staphylococcus* menyebabkan antibiotik tidak dapat bekerja

dengan optimal dan menyebabkan terjadinya resistensi. Bakteri *Staphylococcus* yang membentuk biofilm ini perlu dicarikan alternatif pengendalian infeksi khususnya di Indonesia.

Saat ini, penghambatan pembentukan biofilm *Staphylococcus* telah dirancang sebagai suatu strategi antiinfeksi baru dalam pengendalian infeksi bakteri. Salah satu teknik yang digunakan dalam inhibisi patogenesis bakteri dengan *down* regulasi ekspresi gen *icaA* dan *icaD* *S. aureus* strain MSSA ATCC 25923, MSSA ATCC 6538 dan MRSA ATCC BAA-1707 dengan tumbuhan *Alnus japonica*. Hasil inhibisi *S. aureus* ketiga strain dengan metode *plate biofilm assay* memiliki efektivitas yang berbeda-beda yaitu lebih dari 70% pada konsentrasi 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Hal ini disebabkan ekspresi gen *icaA* dan *icaD* mengatur adhesi *intercellular* bakteri pada pembentukan biofilm *S. aureus* (Lee *et al.*, 2013). Perbedaan strain pada *Staphylococcus* dapat memberikan hasil aktivitas yang bervariasi, sehingga menyebabkan penghambatan yang berbeda pula pada kemampuan antimikroba.

Lee *et al.*, (2013), melaporkan bahwa senyawa quersetin dan tanin ekstrak *A. japonica* *down-regulation* ekspresi gen *icaA* dan *icaD* *S. aureus*. Tumbuhan yang mengandung senyawa terpenoid (Kuzma *et al.*, 2007), asam oleat (Stenz *et al.*, 2008), asam ellagat (Quave *et al.*, 2012), dan 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glukopiranososa (Lin *et al.*, 2011) dapat menurunkan pembentukan biofilm *S. aureus*. Asam tannat pada konsentrasi 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* dengan menghambat ekspresi transglycosylase *Immunodominant staphylococcal antigen A (IsaA)* (Payne *et al.*, 2013). Senyawa turunan flavan (6-chloro-4-(6-chloro-7-hydroxy-2,4,4-trimethylchroman-2-yl) benzene-1,3-dioland) pada konsentrasi 10 μM dan 13 μM juga dilaporkan dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC dan *Newman* secara berurutan sebesar 50% dan 90% (Manner *et al.*, 2013). Loresta *et al.*, (2012) telah melaporkan senyawa tannin dan flavonoid ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dapat menghambat biofilm *S. aureus* dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)* sebesar 4 %. Yamanaka-Okada *et al.*, (2008), juga melaporkan fraksi polifenol *cranberry* berperan menghambat adhesi sel bakteri dengan menghambat sintesis glukosa dengan mereduksi atau menurunkan perlekatan sel pada permukaan substrat yang tidak larut air atau hidrofobik pada *Streptococci mutan*.

Obat herbal kini menarik perhatian serius dari pemerintah, Menteri Kesehatan dalam salah satu program unggulan Departemen Kesehatan tahun 2011, menetapkan obat herbal

atau jamu masuk pelayanan kesehatan primer (www.pbpapdi.org, 2011). Pengobatan tradisional menjadi pilihan masyarakat dikarenakan toksisitas rendah, mudah didapat dan biaya murah. Sehingga, senyawa metabolik sekunder yang terdapat pada tumbuhan menjadi daya tarik luar biasa bagi para peneliti belakangan ini. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mencari alternatif antibiofilm baru yang berasal dari bahan alam dari tumbuhan. Berdasarkan keingintahuan peneliti dipilih tumbuhan *Abrus precatorius* L. untuk dapat dijadikan sebagai alternatif antibiofilm baru dalam pengendalian infeksi *S. aureus*.

Abrus precatorius L. merupakan salah satu tumbuhan perdu liar, tumbuh merambat yang pertumbuhannya cukup cepat dan masih belum banyak diungkap potensinya. Daun *A. precatorius* L. mengandung senyawa steroid dan flavonoid dengan ekstrak etil asetat (Juniarti *et al.*, 2009), senyawa flavonoid, terpenoid, tanin, alkaloid dan saponin (Gnanavel dan Saral, 2013). Menurut Xiao *et al.*, (2012), melaporkan senyawa flavonoid yang diperoleh dari ekstrak etanol daun dan batang *A. precatorius* L., yaitu senyawa glukosida flavanon (2S)5,7,4'-trihydroxyflavanone-8-C- β -D-(6''-O-acetyl) glucopyranoside, vitexin, isohemiphloin, cirsimaritin, hispidulin, apigenin dan eupatorin. Hingga saat ini pemanfaatan tumbuhan *A. precatorius* L. secara farmakologi terbatas, hanya pada daun yang telah dimanfaatkan sebagai obat batuk, pencahar, obat indikatif pencegahan dan penyembuhan sariawan, radang tenggorokan dan radang amandel (Indah dan Darwati, 2013); dan antibakteri (Chaudhari *et al.*, 2012; Garaniya dan Bapodra, 2014). Akan tetapi, secara biologi pengkajian senyawa golongan flavonoid daun *A. precatorius* L. sebagai antibiofilm *S. aureus* belum pernah dilakukan, sehingga pemanfaatannya belum maksimal.

Pada penelitian Lee *et al.*, (2013), melaporkan bahwa golongan flavonoid *A. japonica* ekstrak metanol menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD* *S. aureus* strain MSSA ATCC 25923, MSSA ATCC 6538 dan MRSA ATCC BAA-1707. Berdasarkan kemampuan golongan flavonoid dari daun *A. japonica*, flavonoid dari daun *A. precatorius* L. diharapkan dapat menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD* MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 strain lokal Indonesia, sehingga memberi peluang untuk ditemukan alternatif antibiofilm yang berasal dari *A. precatorius* L.

Berbagai hasil penelitian terhadap tumbuhan *A. precatorius* L., yaitu Ribka (2015), melaporkan bahwa ekstrak etanol daun *A. precatorius* L. dengan konsentrasi 0,6% memiliki aktivitas antibakteri pada *S. aureus* sebesar 0,093 mm. Ernawati (1998), juga melaporkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol daun *A. precatorius* L. menghambat

pertumbuhan *S. aureus* ATCC. Tingkat kepolaran pelarut ekstrak dapat mempengaruhi penghambatan pertumbuhan bakteri. Senyawa yang terkandung dalam tanaman *A. precatorius* L. tidak hanya senyawa yang seluruhnya polar, tetapi ada juga senyawa non polar atau semi polar dan lipofilik. Pelarut etanol, etilasetat dan n-heksana merupakan pelarut organik yang banyak digunakan dalam proses ekstraksi, yang dapat melarutkan senyawa flavonoid, saponin, aglikon flavonoid, steroid dan lain-lain (Siregar *et al.*, 2012).

Berdasarkan uraian tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas inhibisi ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. terhadap pembentukan biofilm dan ekspresi gen *icaA* dan *icaD* MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 isolat lokal Indonesia. Sehingga, diperoleh informasi mengenai senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya dan diharapkan dapat menjadi *lead compound* untuk pengembangan alternatif antibiofilm dalam pengendalian infeksi *Staphylococcus* di masa depan.

Identifikasi bakteri isolat MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik morfologi, biokimia dan mengidentifikasi secara akurat pada tingkatan spesies secara molekuler dengan *sequence-based* gen 16S rRNA. Metode identifikasi mikroorganisme patogen pada laboratorium klinis masih dilakukan secara konvensional, baik secara manual, otomatis dan semi-otomatis (Petti *et al.*, 2005). Kesalahan identifikasi bakteri banyak ditemukan secara konvensional (Moore *et al.*, 2006; Petti *et al.*, 2005). Oleh karena itu, metode molekuler yang relatif lebih cepat, efisien dan akurat dibutuhkan untuk menghindari kesalahan identifikasi bakteri (Cook *et al.*, 2003). Identifikasi molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Gen 16S rRNA memiliki urutan yang khas dan berbeda untuk setiap spesies bakteri, bersifat relatif konstan, serta memiliki laju mutasi yang kecil (Gonzales and Sais-Jimenez, 2005; Janda and Abbott, 2007).

Sekuens gen 16S rRNA memiliki daerah dengan urutan basa yang relatif konservatif dan daerah dengan urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal. Hal ini disebabkan urutan basa sekuens gen 16S rRNA mengalami perubahan relatif lambat dari generasi ke generasi dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Adanya pohon filogenetik dapat diketahui spesies yang memiliki hubungan kekerabatan yang paling terdekat (Pangastuti, 2006).

Bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 dalam penelitian ini diidentifikasi dengan pengamatan morfologi dan uji biokimia. Selanjutnya, untuk mengidentifikasi secara akurat pada tingkatan spesies dilakukan analisis secara molekuler menggunakan *sequence-based* gen 16S rRNA.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut.

1. Berapa kadar flavonoid total ekstrak etil asetat dan etanol yang diperoleh dari serbuk daun *A. precatorius* L.?
2. Bagaimanakah karakteristik morfologi dan fisiologi bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 yang diperoleh dari urin pasien infeksi saluran kemih?
3. Apa nama spesies dari MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 dari hasil analisis karakteristik genetika bakteri menggunakan 16S rRNA?
4. Bagaimanakah hubungan kekerabatan MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 melalui pembuatan pohon filogeni dan posisi bakteri tersebut di beberapa urutan basa DNA *S. aureus* yang ada di *Genebank*?
5. Apakah pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366?
6. Berapa nilai *Minimum Inhibition Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 oleh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L.?
7. Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. dalam menghambat pembentukan biofilm MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366?
8. Berapa nilai *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* (MBIC) dan *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC) bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 oleh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L.?
9. Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. terhadap perubahan hidrofobisitas MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366?
10. Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. terhadap perubahan ekspresi gen *icaA* dan *icaD* MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakteristik fenotif dan genotif penghambatan pertumbuhan biofilm MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 oleh aktivitas ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L.

1.3.2. Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Menentukan kadar flavonoid total ekstrak etil asetat dan etanol yang diperoleh dari serbuk daun *A. precatorius* L.
2. Menganalisis karakteristik morfologi dan fisiologi bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 yang diperoleh dari urin pasien infeksi saluran kemih.
3. Menentukan nama bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 yang diidentifikasi secara genetika molekuler.
4. Menganalisis hubungan kekerabatan bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 melalui pembuatan pohon filogeni dan posisi bakteri tersebut di beberapa *S. aureus* yang ada di *Genebank*.
5. Menganalisis daya pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. dalam menghambat pembentukan biofilm MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366
6. Menentukan nilai MIC dan MBC bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 oleh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L.
7. Menganalisis daya pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. dalam menghambat pembentukan biofilm MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366
8. Menentukan nilai MBIC dan MBEC bakteri MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 oleh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L.
9. Menganalisis perubahan hidrofobisitas MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 oleh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L.
10. Menganalisis penurunan ekspresi gen *icaA* dan *icaD* MRSA 22372, MSSA 22187 dan MSSA 22366 oleh pemberian ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. yang memberikan penghambatan tertinggi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini memberikan kontribusi informasi ilmiah tentang karakteristik fenotip penghambatan pertumbuhan biofilm *Staphylococcus* dan karakteristik genotif penurunan ekspresi gen *icaA* dan *icaD* *Staphylococcus* oleh ekstrak etil asetat dan etanol daun *A. precatorius* L. Sehingga, daun *A. precatorius* L. yang mengandung senyawa golongan flavonoid dapat dijadikan sebagai *lead compound* untuk pengembangan alternatif antibiofilm dalam pengendalian infeksi *Staphylococcus*.

1.4.2. Manfaat praktis

Manfaat penelitian praktis dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Dasar pertimbangan untuk memilih penggunaan obat tradisional yang aman dan efektif dalam menurunkan pembentukan biofilm *Staphylococcus* pada perangkat alat kesehatan.
2. Sebagai alternatif untuk memilih obat tambahan, selain pemberian antibiotik pilihan dengan dosis tepat dan teratur dalam menurunkan patogenesis pada infeksi *Staphylococcus*
3. Dasar acuan untuk merancang *lead compound* alternatif pengembangan penghambat pertumbuhan biofilm *Staphylococcus* sebagai upaya tindakan pencegahan infeksi *Staphylococcus*