

**UJI DAYA HAMBAT *NEOBAVAISOFLAVONE* TERHADAP
PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO***

Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation with
Neobavaisoflavone In vitro



Andi Rofian Sultan

C1195182001

Pembimbing 1:

dr. Baedah Madjid, SpMK(K)

Pembimbing 2:

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., SpMK(K)

PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI FASILITAS KESEHATAN

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS HASANUDDIN

2022

**UJI DAYA HAMBAT NEOBAVAISOFLAVONE TERHADAP
PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA
IN VITRO**

**Karya Akhir
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis**

**Program Studi Mikrobiologi Klinik
Disusun dan diajukan oleh**

ANDI ROFIAN SULTAN

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
MIKROBIOLOGI KLINIK FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

KARYA AKHIR
UJI DAYA HAMBAT *NEOBAVAISOFLAVONE* TERHADAP
PEMBENTUKAN BIOFILM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
SECARA *IN VITRO*

Disusun dan diajukan oleh :
ANDI ROFIAN SULTAN
Nomor Pokok : C195182001

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
Pada Tanggal 24 November 2022
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat

Pembimbing Utama



dr. Baedah Madjid, Sp.MK(K)

Pembimbing Anggota



Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK(K)

Manager Program Pendidikan
Dokter Spesialis
Fakultas Kedokteran UNHAS



Dr. dr. A. M. Fakhrul Masha, Sp.An-KMN
NIP. 197310142006011009

Dekan Fakultas Kedokteran UNHAS



Prof. Dr. dr. Hauram Rasyid, M.Kes., Sp.PD-KGH., Sp.GK.
NIP. 1968530 1996032001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : ANDI ROFIAN SULTAN
Nomor pokok : C195182001
Program studi : Mikrobiologi Klinik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 24 November 2022

yang menyatakan



ANDI ROFIAN SULTAN

Ucapan Terima Kasih

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanawataalla atas segala berkat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis yang berjudul “Uji Daya Hambat *Neobavaisoflavone* Terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* Secara in Vitro”.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada para pembimbing dan penguji yang telah banyak membantu dalam penyusunan tesis ini:

1. dr. Baedah Madjid, Sp.MK (K) sebagai penasehat utama yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam penyusunan tesis ini.
2. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK(K) selaku anggota penasehat yang juga telah membimbing dan mengarahkan dalam penyusunan tesis ini.
3. Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK selaku tim penilai yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran demi perbaikan tesis ini.
4. Willem J. B. van Wamel, Ph.D. selaku anggota tim penilai yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran demi perbaikan tesis ini.
5. dr. Firdaus Hamid, Ph.D., Sp.MK selaku anggota tim penilai yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran demi perbaikan tesis ini.
6. Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku anggota tim penilai yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran demi perbaikan tesis ini.

Penulis persembahkan tesis ini sebagai rasa terima kasih yang tulus kepada keluarga penulis yang telah banyak memberikan semangat selama penyusunan tesis ini. Terima kasih banyak kepada semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam penyusunan tesis ini. Penulis menyadari bahwa tesis ini tidak luput kesalahan, sehingga dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak.

Makassar, 24 November 2022



Andi Rofian Sultan

ABSTRAK

ANDI ROFIAN SULTAN. *Uji Daya Hambat Neobavaisoflavone terhadap Pembentukan Biofilm Staphylococcus aureus Secara in Vitro* (dibimbing oleh Baedah Madjid dan Mochammad Hatta).

Infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* terkait biofilm sulit diberantas dengan antibiotik yang tersedia saat ini dan biasanya tetap membutuhkan intervensi radikal berupa pembedahan. Pada penelitian sebelumnya telah didemonstrasikan bahwa neobavaisoflavone, senyawa isoflavon yang diisolasi dari tumbuhan mampu memotensiasi kemampuan antibiotik untuk menghambat pertumbuhan tipe planktonik dari bakteri *S. aureus*. Karena itu, pada penelitian ini kami mempelajari efek senyawa ini terhadap biofilm *S. aureus* secara *in vitro*. Isolat klinis *S. aureus* dari berbagai jenis latar belakang genetik ditumbuhkan secara *in vitro* untuk membentuk biofilm menggunakan *iscope's modified dulbecco's medium* (IMDM) dengan atau tanpa penambahan 10% *fetal calf serum* (FCS). Pengamatan terhadap efek neobavaisoflavone bagi massa dan komposisi biofilm dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan klasik dengan kristal violet dan juga dengan pewarnaan LIVE/DEATH yang dikombinasikan dengan pewarnaan *N-Acetylglucosamine*. Selain itu, *isothermal microcalorimetry* digunakan untuk memantau efek senyawa ini pada metabolisme bakteri yang tumbuh di dalam biofilm secara langsung (*real time*). *Competitive luminex assay* dan *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) *assay* digunakan untuk mengukur produksi faktor-faktor virulensi biofilm *S. aureus*. Dosis sub-MIC dari senyawa neobavaisoflavone mampu menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*, termasuk biofilm *S. aureus* (MRSA) MW2 yang resisten *Methicillin* (MRSA) dan *S. aureus* (VISA) strain *Vancomycin-intermediate S. aureus* (VISA) Mu-50. Namun, pemantauan secara *real-time* pada tingkat metabolik dari bakteri *S. aureus* di dalam biofilm tidak menunjukkan penurunan secara signifikan ketika neobavaisoflavone ditambahkan pada biofilm. Lebih lanjut, pengamatan efek neobavaisoflavone terhadap produksi faktor virulensi *S. aureus* saat pembentukan biofilm menunjukkan adanya penurunan produksi *thermonuclease*. Meskipun efek neobavaisoflavone terhadap pembentukan massa biofilm bisa ditunjukkan, pengamatan secara langsung mengenai efek senyawa ini terhadap tingkat metabolisme bakteri *S. aureus* dalam biofilm tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ketika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan neobavaisoflavone hanya mampu menghambat replikasi bakteri, namun proses metabolisme lain seperti produksi faktor tetap berlangsung.



ABSTRACT

ANDI ROFIAN SULTAN. *The Drag Test of Neobavaisoflavone on Biofilm Formation of Staphylococcus aureus in in vitro Method* (supervised by Baedah Madjid and Mochammad Hatta).

An infection of the *Staphylococcus aureus* bacterium related to the biofilm is difficult to eradicate using the antibiotics being available at the moment and usually still needing a radical intervention in the form of a surgery. In the previous research, it has been denoted that the neobavaisoflavone, isoflavone compound isolated from plants can potentiate the antibiotic capacity to inhibit the planktonic type growth from the *S. aureus* bacterium, Therefore, the research aims to describe the compound effect on the *S. aureus* biofilm in *in vitro* method. The *S. aureus* clinical isolate from various genetic background types was grown in *in vitro* method to from the biofilm using the Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), with or without the addition of 10% fetal calf serum (FCS). The observation towards the effect of the neobavaisoflavone on the biofilm mass and composition was conducted using the classical colouration method with the violet crystal and also using LIVE/DEATH colouration combined with N-Acetylglucosamine colouration. Furthermore, the *isothermal microcalorimetry* was used to monitor the compound effect on the bacterium metabolism which grows in the real time biofilm. The *Competitive luminex assay* and *fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay* were used to measure the production of the *S. aureus* biofilm virulence factors. The research result indicates that the sub-MIC dosage from the neobavaisoflavone is able to inhibit the *S. aureus* biofilm formation including the *S. aureus* biofilm (MRSA) MW2 which is Methicillin resistance (MRSA) and *S. aureus* (VISA) Mu50. However, the real time way monitoring in the metabolic level from the *S. aureus* bacterium in the biofilm does not indicate the significant decrease when the neobavaisoflavone is added to the biofilm. Moreover, the observation of the neobavaisoflavone effect on the *S. aureus* virulence factor production when the biofilm formation shows that there is the *thermonuclease (nuc)* production decrease. Although the neobavaisoflavone effect on the biofilm mass formation can be shown, the direct observation on the compound effect towards the metabolism level of the *S. aureus* bacterium in the biofilm does not indicate the significant difference when compared with the control. This is possible because the neobavaisoflavone can only inhibit the bacterium replication, but the another metabolism process such as the virulence factor production can still continue.

Key words: neobavaisoflavone, biofilm, *Staphylococcus aureus*, *in vitro*



DAFTAR ISI

	Halaman
Ucapan Terima Kasih	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN, DAN LAMBANG.....	xiii
BAB I	15
PENDAHULUAN.....	15
1.1. Latar Belakang	15
1.2. Rumusan Masalah	16
1.3. Pertanyaan Penelitian	16
1.4. Tujuan Penelitian.....	17
1.4.1. Tujuan umum	17
1.4.2. Tujuan khusus.....	17
1.5. Manfaat Penelitian.....	17
1.6. Ruang Lingkup Penelitian.....	17
1.7. Kebaruan Penelitian	17
BAB II	18
TINJAUAN PUSTAKA	18
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.1.1. Defenisi	18
2.1.2. Epidemiologi.....	19
2.1.3. Klasifikasi	19
2.1.4. Patogenesis.....	19
2.1.5. Isolasi dan identifikasi.....	20
2.2. Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.2.1. Biofilm dan modulasi sel imun inang.....	22
2.2.2. Biofilm dan resistensi anti-mikroba.....	23
2.3. Identifikasi dan Penanganan Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.3.1. Identifikasi biofilm	25

2.3.2. Penanganan biofilm	25
2.4. Tumbuhan Sebagai Alternatif Sumber Anti-mikroba	26
2.4.1. Zat aktif dalam tumbuhan.....	26
2.4.2. <i>Neobavaisoflavone</i>	28
2.5. Uji hambat pembentukan biofilm	29
2.6. Kerangka Pikir.....	30
BAB III	31
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	31
3.1. Kerangka Konsep.....	31
3.2. Hipotesis penelitian	31
3.3. Definisi Operasional	31
3.3.1 Isolat <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.3.2 Biofilm.....	32
3.3.3 <i>Neobavaisoflavone</i>	32
BAB IV.....	33
METODE PENELITIAN.....	33
4.1. Metode dan Rancangan Penelitian.....	33
4.1.1 Jenis penelitian	33
4.1.2 Rancangan penelitian	33
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	33
4.2.1. Lokasi Penelitian	33
4.2.2. Waktu Penelitian.....	33
4.1. Populasi dan Sampel	34
4.3.1. Populasi Penelitian.....	34
4.3.2. Sampel	34
4.2. Kriteria Sampel Penelitian	34
4.4.1. Kriteria inklusi.....	34
4.4.2. Kriteria eksklusi.....	34
4.4.3. Kriteria drop out	34
4.5. Jumlah Sampel	35
4.6. Alur Penelitian	36
4.7. Prosedur Kerja	36
4.7.1. Reanimasi isolat	36

4.7.2.	Pembentukan biofilm dan uji daya hambat dengan <i>neobavaisoflavone</i> dan rifampicin.....	36
4.7.3.	Visualisasi komponen penyusun biofilm <i>S. aureus</i>	38
4.7.4.	Kuantifikasi tingkat metabolisme bakteri dalam biofilm.....	38
4.7.5.	Pengumpulan supernatan biofilm.	39
4.7.6.	Kuantifikasi produksi faktor virulensi oleh biofilm <i>S. aureus</i> dengan competitive luminex assay.....	39
4.7.7.	Kuantifikasi aktivitas termonuklease dengan uji berbasis Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).....	41
4.6.	Alat dan Bahan.....	42
4.7.	Cara Pengambilan Data	43
4.8.	Pengolahan dan Analisa Data	43
4.9.	Aspek Etik Penelitian.....	44
BAB V.....		45
HASIL, PEMBAHASAN DAN HAMBATAN PENELITIAN.....		45
5.1 Hasil Penelitian		45
5.1.1	Efek biofilm terhadap massa biofilm.....	45
5.1.2	Efek <i>neobavaisoflavone</i> terhadap viabilitas dari biofilm <i>S. aureus</i>	47
5.1.3	Efek <i>neobavaisoflavone</i> terhadap produksi factor virulens biofilm <i>S. aureus</i>	49
5.2 Pembahasan		52
5.3 Hambatan Penelitian		55
BAB VI.....		56
PENUTUP		56
6.1 Kesimpulan.....		56
6.2 Saran		56
DAFTAR PUSTAKA.....		57
LAMPIRAN		68
A. Lampiran 1. Jadwal Pelaksanaan.....		68
B. Lampiran 3. Surat izin Penelitian dari KPS		69
C. Lampiran 4. <i>Ethical Clearance</i>		70

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Siklus pertumbuhan biofilm <i>S. aureus</i>	21
Gambar 2.2 Mekanisme resistensi biofilm <i>S. aureus</i>	24
Gambar 2.3 Kerangka Pikir	30
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	31
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	33
Gambar 4.2 Alur Penelitian	36
Gambar 5.1 Neobavaisoflavone dan massa biofilm.	45
Gambar 5.2 Neobavaisoflavone dan viabilitas biofilm.....	46
Gambar 5.3 Sensitivitas biofilm terhadap neobavaisoflavone	47
Gambar 5.4 Sensitivitas biofilm terhadap neobavaisoflavone	48
Gambar 5.5 Neobavaisoflavon dan produksi faktor virulensi biofilm <i>S.</i> <i>aureus</i>	50
Gambar 5.6 Neobavaisoflavone dan produksi thermonuclease	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Isolat yang digunakan	35
Tabel 4.2 Tabel Alat dan Bahan	42

DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN, DAN LAMBANG

Lambang/singkatan	Arti dan penjelasan
%	<i>Persen</i>
µg	<i>Microgram</i>
µL	<i>Microliter</i>
µM	<i>Micromolar</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptide</i>
BA	<i>Blood Agar</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CHIPS	<i>Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci</i>
dH ₂ O	<i>Distilledwater</i>
DMSO	<i>Dimethyl-sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	<i>Deoksiribonuklease</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
eDNA	<i>Ekstraseluler DNA</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoassay</i>
EtOH	<i>Ethyl-Alcohol</i>
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FM TM 1-43	<i>N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium Dibromide</i>
H ₀	<i>Null hypothesis</i>
H ₂ O ₂	<i>Hidrogen Peroxide</i>
Ha	<i>Alternative Hypothesis</i>
IMDM	<i>Medium Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
mL	<i>milliliter</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSA	<i>Mannitol Salt Agar</i>
MSSA	<i>Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus</i>
NaCl	<i>Natrium Chloride</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
Nm	<i>Nano Meter</i>
Nuc	<i>Thermonuclease</i>
OC	<i>Celcius</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PBP	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PBP-2a	<i>Penicillin-binding proteins-2a</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PIA	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>
PNAG	<i>poli-β(1-6)-N-acetylglucosamine</i>
R&D	<i>Research and Development</i>

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
Rpm	<i>Revolution Per Minute</i>
SCIN	<i>Staphylococcal Complement Inhibitor</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TSA	<i>Triptic Soy Agar</i>
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Biofilm didefinisikan sebagai agregat mikroorganisme di mana sel-sel bakteri diselubungi oleh matriks yang terbentuk dari zat polimer ekstraseluler yang melekat satu sama lain dan/atau pada permukaan jaringan atau implant (Donlan, 2002, Arciola et al., 2015, Sadovskaya et al., 2005, Merino et al., 2009, Montanaro et al., 2011, Rice et al., 2007, Whitchurch et al., 2002).

Lebih dari 70% kasus infeksi tulang dan sendi disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* yang berkaitan dengan biofilm (Iliadis and Ramachandran, 2017, Ashong et al., 2017, Dusane et al., 2018). Infeksi *S. aureus* terkait biofilm sulit diobati karena sel bakteri yang terbungkus di dalam biofilm bisa sangat resisten terhadap antibiotik dan respon imun dari inang (Singh et al., 2010, Stewart and Costerton, 2001, Jefferson, 2004, Sultan et al., 2019a, Sultan et al., 2018a)

Adanya matriks ekstraseluler yang melindungi bakteri di dalam biofilm merupakan salah satu ciri khas biofilm yang membedakannya dari bentuk planktonik bakteri. Matriks tersebut berfungsi sebagai perisai (Joo and Otto, 2015a) yang mampu melindungi bakteri dari sistem kekebalan alami inang seperti *antimicrobial peptide* (AMP) dan juga dari proses fagositosis. Matriks ekstraseluler dapat mengurangi penetrasi antibiotik ke dalam biofilm sehingga pada akhirnya dapat menyebabkan kegagalan pengobatan, infeksi berkepanjangan serta komplikasi yang lebih berat seperti bakteremia atau bahkan kematian (Wyllie et al., 2006, Tong et al., 2015, Lothar and Press, 2017). Terlepas dari kenyataan bahwa bakteri terkait biofilm berbeda dari bentuk planktoniknya, pengujian kerentanan antimikroba saat ini untuk *S. aureus* yang diisolasi dari infeksi terkait biofilm masih menggunakan bakteri planktonik. Sayangnya, praktik ini mengarah pada perkiraan yang berlebihan (*overestimation*) terhadap efektivitas antibiotik yang diujikan dan mengabaikan fakta bahwa bakteri yang berasosiasi dengan biofilm memiliki toleransi yang tinggi terhadap antibiotik (Bull et al., 2014, Pancholi et al., 2018). Toleransi bakteri terhadap antibiotik bersifat intrinsik dan

umumnya tidak memerlukan perubahan di tingkat gen (*genomic*) (Corona and Martinez, 2013, Bull et al., 2014). Munculnya populasi sel persisten bakteri (Lewis, 2010, Lewis, 2007, Donlan and Costerton, 2002a) dan pembentukan matriks ekstraseluler (Arciola et al., 2015, Sadovskaya et al., 2005, Merino et al., 2009, Montanaro et al., 2011, Rice et al., 2007, Whitchurch et al., 2002, Alves et al., 2020) adalah salah satu penyebab utama toleransi biofilm terhadap terapi antibiotik. Sampai saat ini anti-mikroba yang secara spesifik bekerja pada biofilm hampir tidak ada. Sejauh ini hanya rifampicin yang diakui memiliki efek anti-biofilm yang cukup memuaskan. Sayangnya, penggunaan rifampicin juga masih kontroversial dikarenakan mudahnya *S. aureus* menjadi resisten terhadap antibiotik ini (Sultan et al., 2022). Karena itu pencarian kandidat anti-mikroba baru yang juga memiliki efek anti-biofilm perlu diprioritaskan. Sejauh yang kami ketahui anti-biofilm yang dikembangkan dari senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh bakteri atau fungi masih kurang memberikan hasil memuaskan dikarenakan kecenderungan munculnya strain atau isolat bakteri yang resisten terhadap senyawa-senyawa tersebut. Dengan memperhatikan fakta bagaimana tumbuhan begitu *resilient* terhadap serangan hama terutama bakteri (Abreu et al., 2017), karena itu metabolit atau senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan mungkin bisa dipertimbangkan sebagai alternatif sumber kandidat anti-biofilm.

1.2. Rumusan Masalah

Keberadaan populasi sel persisten di dalam biofilm juga membuat *S. aureus* lebih resisten terhadap sebagian besar antibiotik yang saat ini tersedia di fasilitas-fasilitas kesehatan sehingga menyebabkan pengobatan sangat sulit dan perawatan penderita menjadi lebih lama. Oleh karena itu dengan melihat kesulitan yang dihadapi di fasilitas kesehatan dalam mengatasi atau mengobati infeksi yang berkaitan dengan biofilm *S. aureus*, diperlukan kandidat anti-biofilm baru.

Rumusan masalah penelitian ini adalah apakah senyawa *neobavaisoflavone* mampu menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*?

1.3. Pertanyaan Penelitian

1. Apakah senyawa *neobavaisoflavone* mampu menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* secara *in vitro*?

2. Apakah *neobavaisoflavone* mempunyai efek terhadap viabilitas sel bakteri dalam biofilm?

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan umum

Untuk menguji daya hambat neobavisoflavone terhadap pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* secara *in vitro*

1.4.2. Tujuan khusus

1. Untuk melihat efek hambatan *neobavaisoflavone* terhadap pembentukan biofilm *S. aureus in vitro*
2. Untuk melihat efek *neobavaisoflavone* terhadap viabilitas sel bakteri *S. aureus* di dalam biofilm

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini akan memberikan data awal (*proof of concept*) mengenai alternatif pilihan anti-biofilm yang saat ini sangat terbatas bahkan belum tersedia di fasilitas kesehatan. Selain itu penelitian ini akan menyediakan protokol sederhana yang akan membuka jalan bagi penemuan kandidat-kandidat baru anti-biofilm *S. aureus* baik itu dari tumbuhan maupun dari sumber lainnya.

1.6. Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini akan menguji efek hambat salah satu senyawa isoflavone tumbuhan terhadap pembentukan biofilm *S. aureus in vitro*.

1.7. Kebaruan Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengembangkan produk anti-biofilm baru dengan menggunakan informasi dari penelitian sebelumnya yang menunjukkan potensi efek anti-bakteri dari senyawa *isoflavone* (*neobavaisoflavone*) dari tumbuhan terhadap *S. aureus*. Informasi atau penelitian tentang efek anti-biofilm dari senyawa-senyawa yang diisolasi dari tumbuhan sejauh ini masih sangat minim, karenanya melalui penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan produk anti-biofilm yang sangat dibutuhkan dalam mengatasi infeksi-infeksi yang berkaitan dengan biofilm *S. aureus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan salah satu patogen utama yang bisa menyebabkan berbagai keluhan klinis mulai dari keluhan ringan seperti infeksi kulit dan jaringan lunak maupun infeksi yang lebih berat seperti bakteremia, endokarditis infektif, osteomyelitis dan peradangan pada jaringan paru serta pleura (Ribeiro et al., 2012, McConoughey et al., 2014, Tong et al., 2015). Selain itu, *S. aureus* juga merupakan salah satu penyebab pada kasus–kasus infeksi penderita dengan riwayat penggunaan alat medik seperti implan atau instrumen medis invasif lainnya (Ribeiro et al., 2012, McConoughey et al., 2014, Tong et al., 2015). Dalam beberapa tahun terakhir, kita menyaksikan dua perubahan pola epidemiologi dari infeksi oleh *S. aureus*. Pertama, terjadinya peningkatan infeksi yang berhubungan dengan fasilitas kesehatan seperti infeksi pada penggunaan alat prostetik. Dan yang kedua, yang cukup mengkhawatirkan, adalah peningkatan angka penyebaran isolat *S. aureus* yang multi-resisten di masyarakat, misalnya isolat-isolat yang resisten terhadap antibiotik golongan β -*lactam* serta penyebaran isolat-isolat dengan sifat virulensi yang tinggi, misalnya isolat dengan kemampuan produksi immune modulator yang potent (Tong et al., 2015) yang dapat melawan sel imun inang.

2.1.1. Defenisi

Staphylococcus aureus adalah bakteri berbentuk bulat (kokkus), bersifat gram positif yang mampu menghancurkan (hemolisis) sel-sel darah merah dan menghasilkan koagulase dan katalase sebagai salah satu bentuk pertahanan terhadap sistem imun inang tempat *S. aureus* hidup (Tong et al., 2015). *S. aureus* tidak hanya hidup sebagai komensal, namun juga mampu menimbulkan penyakit infeksi pada manusia (Tong et al., 2015).

2.1.2. Epidemiologi

Sekitar 30% dari seluruh populasi manusia dikolonisasi oleh *S. aureus* (Wertheim et al., 2005a). Sementara itu, data dari negara-negara industri maju menunjukkan bahwa sekitar 10-30 per 100.000 penduduk per tahunnya menderita bakteremia yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus* (Laupland et al., 2013).

2.1.3. Klasifikasi

Berdasarkan sifat resistensinya terhadap antibiotik methicillin, *S. aureus* dibagi atas dua kelompok. Yang pertama adalah *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus* (MSSA) dan yang kedua adalah *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang sesuai dengan namanya menunjukkan kemampuan isolat golongan ini untuk bertahan melawan kebanyakan antibiotik golongan β -lactam seperti penicillin dan turunannya dan sebagian besar antibiotik golongan cephalosporin. MRSA umumnya ditemukan pada isolate-isolat *S. aureus* yang beredar di fasilitas Kesehatan, terutama rumah sakit (Kavanagh, 2019, Rodriguez-Bano et al., 2010).

2.1.4. Patogenesis

Meskipun kita telah mengenal *S. aureus* sejak lebih dari seratus tahun yang lalu namun sampai hari ini penyakit infeksi oleh *S. aureus* masih merupakan salah satu masalah kesehatan serius yang sering terjadi baik itu di lingkungan fasilitas kesehatan maupun di masyarakat (Botelho et al., 2019). Permasalahan utama yang dihadapi adalah tingginya angka resistensi bakteri ini terhadap antibiotik-antibiotik yang tersedia saat ini sehingga menyebabkan peningkatan morbiditas maupun mortalitas dari infeksi *S. aureus* (Lowy, 2003, Rolo et al., 2017, Talan et al., 2011). Bila melihat pada patogenesis dari bakteri ini, kesuksesan *S. aureus* dalam mengkolonisasi inangnya tidak hanya berkaitan dengan kemampuan bakteri ini untuk memproduksi enzim yang bisa merusak antibiotik (misalnya enzim β -lactamase) namun berkaitan juga dengan faktor-faktor instrinsik lain. Antara lain kemampuan *S. aureus* untuk memproduksi berbagai faktor virulensi seperti immune modulators (Otto, 2008b) untuk melawan sistem pertahanan tubuh inang, kemampuan *S. aureus* dalam menyesuaikan fenotifnya (*phenotypic plasticity*) dengan kondisi lingkungan di sekitarnya antara lain dengan membentuk *small colony variants* (SCV), menurunkan tingkat metabolismenya sebagai sel persister

(Sendi et al., 2006, Tuchscher et al., 2010) serta kemampuan bakteri ini untuk membentuk biofilm (Hall-Stoodley et al., 2004b, Ricciardi et al., 2018) pada kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan.

2.1.5. Isolasi dan identifikasi

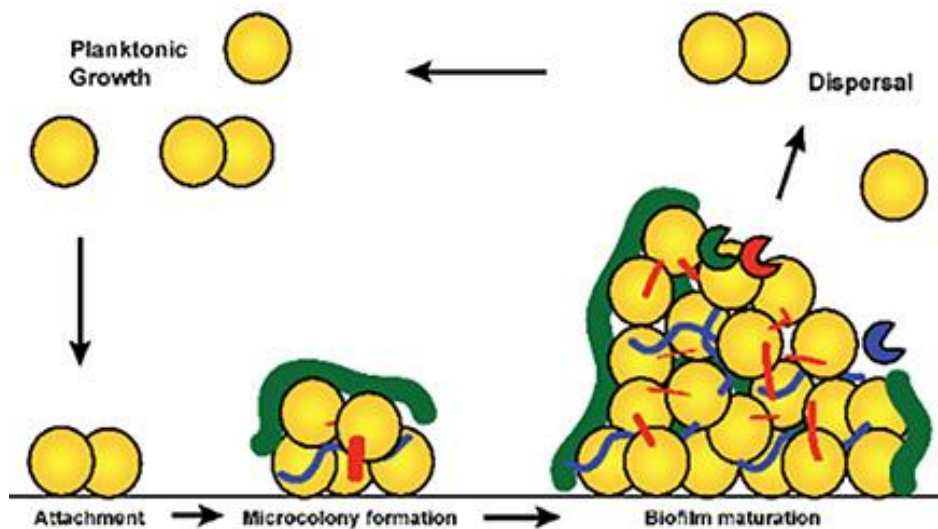
Kecurigaan akan adanya adanya *S. aureus* pada lesi atau spesimen klinik biasanya dikonfirmasi awal dengan pemeriksaan pewarnaan Gram langsung. Namun, untuk beberapa jenis spesimen tertentu misalnya darah, jumlah bakteri biasanya terlalu kecil untuk dilakukan pengamatan langsung secara mikroskopis dan memerlukan kultur terlebih dahulu. *S. aureus* diisolasi dengan mengapuskan bahan dari spesimen klinis (atau dari kultur darah) ke media padat seperti agar darah, ataupun pada *tryptic soy agar* (TSA) (Surewaard et al., 2016, Jensen, 2002, Hadano et al., 2018).

Apabila spesimen kemungkinan terkontaminasi dengan mikroorganisme lain, maka dapat digunakan *mannitol salt agar* (MSA) yang mengandung 7,5% natrium klorida, sehingga hanya Staphylococcus yang memang diketahui toleran terhadap garam kadar tinggi yang dapat tumbuh pada media ini (salah satunya *S. aureus*) (Han et al., 2007). Idealnya pewarnaan Gram pada koloni yang tumbuh harus dilakukan dan kemudian dilanjutkan dengan uji biokimia berupa tes katalase dan tes koagulase, *S. aureus* dikenal menghasilkan katalase dan koagulase sebagai salah satu bentuk pertahanan diri mereka terhadap respon imun inang, sehingga dengan dasar ini uji biokimia bisa digunakan untuk membedakan *S. aureus* dari spesies Staphylococcus lainnya (Hadano et al., 2018, Murdoch and Greenlees, 2004, McDonald and Chapin, 1995). Tes lain yang sangat berguna untuk identifikasi *S. aureus* adalah metode identifikasi produksi deoksiribonuklease (DNAse) thermostabil yang khas untuk untuk *S. aureus*. *S. aureus* dapat pula dikonfirmasi dengan tes aglutinasi dengan partikel lateks yang dilapisi dengan imunoglobulin G dan fibrinogen yang mengikat secara spesifik protein A dan faktor penggumpalan dari *S. aureus* (misalnya, Staphaurex) (Stutz et al., 2011). Saat ini, identifikasi spesies Staphylococcus termasuk *S. aureus* di laboratorium klinik telah menggunakan sistem otomasisasi yang lebih praktis dibandingkan dengan uji-uji manual. Salah satu contoh yang paling sering digunakan adalah dengan identifikasi spesies dengan VITEK system yang bisa

sekaligus mengidentifikasi sifat resistensi dari *S. aureus* terhadap antibiotik (Spanu et al., 2003, Ligozzi et al., 2002).

2.2. Biofilm *Staphylococcus aureus*

Berbeda dengan kondisi pertumbuhan yang ada di laboratorium, dimana bakteri tumbuh sebagai plankton dalam medium yang kaya akan nutrisi, bakteri yang hidup di alam termasuk di lingkungan *in vivo* biasanya tidak memiliki akses yang cukup terhadap ketersediaan langsung nutrisi karenanya bakteri tersebut membentuk agregasi sel atau yang dikenal sebagai biofilm sebagai salah satu bentuk perlindungan diri (Hall-Stoodley et al., 2004a). Dalam pembentukan biofilm, bakteri menghasilkan extracellular matrix (ECM) yang terdiri atas protein, karbohidrat dan DNA ekstraseluler (eDNA) (Flemming and Wingender, 2010) yang akan membungkus sel bakteri dan melindunginya dari lingkungan luar yang tidak bersahabat.



Gambar 2.1 Siklus pertumbuhan biofilm *S. aureus*

Sumber: Lister and Horswill, 2014

Proses pembentukan biofilm memiliki beberapa tahap (Gambar 2.1). Singkatnya, setelah bersentuhan dengan permukaan seperti jaringan ataupun implant, sel-sel planktonik menempel dengan menggunakan protein yang berikatan dengan permukaan (adherence protein). Setelah perlekatan, sel membelah dan memulai produksi matriks ekstraseluler, yang mengarah pada pembentukan mikrokoloni. Saat pembelahan sel berlanjut, biomassa terakumulasi dan biofilm matang terbentuk. Sinyal lingkungan (*quorum sensing*) dalam biofilm

memicu aktivasi mekanisme penyebaran, dan setelah penyebaran, sel-sel memasuki kembali keadaan pertumbuhan planktonik dan dapat menyemai di lokasi yang baru untuk pembentukan biofilm (Lister and Horswill, 2014, Moormeier and Bayles, 2017). Paparan antibiotik akan membunuh sel-sel planktonik yang rentan dan sel-sel yang aktif secara metabolik di dekat permukaan biofilm. Namun, sel-sel persisten atau sel-sel yang tidak aktif secara metabolik di dalam biofilm dapat bertahan dan tetap terlindungi dari pertahanan imun oleh matriks biofilm (Lister and Horswill, 2014, Joo and Otto, 2015b).

2.2.1. Biofilm dan modulasi sel imun inang

Pertahanan imun inang seringkali tidak efektif untuk mencegah atau membasmi bakteri terkait biofilm (Joo and Otto, 2015b). Neutrofil adalah sel kekebalan pertama yang bereaksi terhadap infeksi. Reaksi ini memicu respon inflamasi yang berupa koagulasi, aktivasi komplemen dan aktivasi platelet (Franz et al., 2011). Neutrofil biasanya memiliki tiga mekanisme antimikroba yang berbeda: fagositosis, proses degranulasi, dan pembentukan *Neutrophil extracellular Traps* (NETs) atau NETosis (Kolaczkowska and Kubes, 2013). NETosis dapat diinduksi melalui jalur yang melibatkan pengaktifan spesies oksigen reaktif (ROS) ataupun melalui jalur yang independen terhadap ROS (Remijsen et al., 2011, Götz and Peters, 2014).

Modulator imun yang poten seperti *Chemotaxis inhibitory protein of staphylococci* (CHIPS), *staphylococcal Complement inhibitor* (SCIN), *formyl peptide receptor-like 1 inhibitor*, *gamma-hemolysin component B*, *leucocidins*, *staphylococcal superantigen-like proteins* dan *staphylococcal enterotoksin* disekresikan oleh *S. aureus* biofilm (Archer et al., 2011, Sultan et al., 2018a), hal ini menunjukkan bahwa *S. aureus* yang berasosiasi dengan biofilm mampu memodulasi sistem imun bawaan. mengingat lebih dari 60% dari total populasi leukosit manusia adalah neutrofil dan neutrofil memainkan peran penting selama tahap awal infeksi *S. aureus*, banyak dari faktor virulensi bakteri ini ditargetkan terhadap neutrofil (de Jong et al., 2019). Sementara *S. aureus* adalah penginduksi kuat NET, di mana neutrofil mengeluarkan DNA, histon, dan peptida antimikroba mereka untuk membasmi bakteri (Brinkmann et al., 2004, Berends et al., 2010), respons bawaan ini dapat dengan cepat diatasi oleh enzim thermonuclease (nuc) yang diproduksi oleh *S. aureus* (Berends et al., 2010). Dikarenakan pembentukan

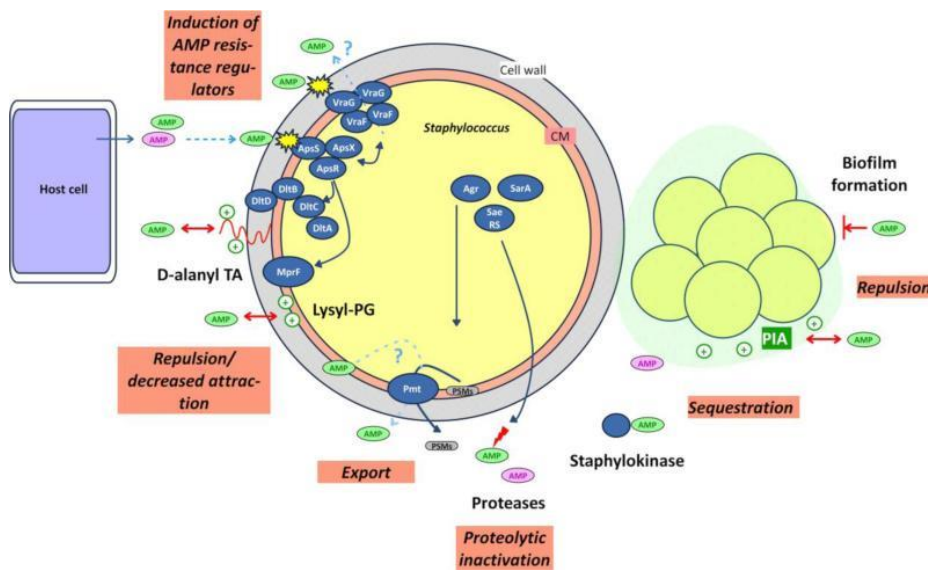
NETs biasanya diikuti oleh kematian neutrofil yang terlibat (Fuchs et al., 2007), fenomena ini mencerminkan strategi "umpan dan hancurkan" yang digunakan oleh *S. aureus* untuk memanipulasi respon imun bawaan inang. Aktivasi neutrofil yang diinduksi oleh biofilm menyebabkan kelelahan metabolik dan penipisan sumber daya oksidatif karena pelepasan spesies oksigen reaktif secara terus menerus, sehingga mengurangi kapasitas neutrofil untuk membunuh bakteri (Patel et al., 2007).

2.2.2. Biofilm dan resistensi anti-mikroba

Dalam beberapa tahun terakhir, kemampuan membentuk biofilm oleh patogen telah menjadi fokus penelitian dengan mengingat tidak hanya kemampuan biofilm dalam melawan sistem pertahanan imun inang (Otto, 2008a, Otto, 2006), namun juga terhadap efektifitas antibiotik (Donlan and Costerton, 2002b). *S. aureus* telah dikenal sebagai salah satu penyebab infeksi kronik karena sifat resistensinya terhadap pengobatan dengan jalan membentuk biofilm pada implant/perangkat medis termasuk pada katup jantung artifisial, kateter dan sendi prostetik (Tzeng et al., 2015, McConoughey et al., 2014, Ribeiro et al., 2012). Infeksi terkait biofilm diketahui berkaitan dengan peningkatan morbiditas dan mortalitas, dimana implant atau perangkat medis yang terinfeksi seringkali memerlukan pengangkatan melalui pembedahan dan karenanya memperpanjang masa rawat inap. Akibatnya, prevalensi infeksi *S. aureus* terkait biofilm telah menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam pembiayaan selama dekade terakhir, dengan perkiraan biaya tahunan mendekati \$450 juta (Parvizi et al., 2010, Song et al., 2010). Oleh karenanya pemahaman yang lebih baik tentang *S. aureus* terkait biofilm sangat penting dalam rangka upaya menemukan strategi pengobatan baru terkait biofilm

Walaupun sel-sel persisten sering dikaitkan dengan biofilm, namun sel sel dengan metabolisme normal juga dapat ditemukan di dalam biofilm (Sultan et al., 2018a, Sultan et al., 2022). Semua jenis sel tersebut bersama-sama terbungkus dalam EPS, yang memfasilitasi resistensi bakteri didalamnya terhadap anti mikroba (Pendleton et al., 2013, Peyrusson et al., 2020). Hal ini membuat biofilm sulit untuk dieradikasi dengan menggunakan antibiotik standar yang tersedia di fasilitas kesehatan saat ini. Infeksi *S. aureus* terkait biofilm seperti osteomyelitis ataupun endokarditis sejauh ini hanya bisa diatasi dengan intervensi bedah untuk membuang fokus infeksi yakni biofilm itu sendiri. Namun pada kenyataannya,

pengobatan progresif dan infasif tersebut belum mampu secara penuh untuk menyingkirkan sel persisten dan biofilm yang ada sehingga harus dikombinasikan dengan pengobatan anti mikroba yang sampai saat ini tidak satupun secara spesifik mampu mengatasi biofilm *S. aureus* .



Gambar 2.2 Mekanisme resistensi biofilm *S. aureus*

Sumber: Joo and Otto, 2015b

Peningkatan massa biofilm dikaitkan dengan peningkatan komponen biofilm yang kaya akan *N-Acetyl glucosamine*, atau dikenal sebagai *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA). PIA adalah *poli-β(1-6)-N-acetylglucosamine* (PNAG) bermuatan positif dan merupakan komponen eksopolisakarida yang dominan dari matriks polimer ekstraseluler biofilm (Arciola et al., 2015, Joo and Otto, 2015b). Selain itu, PIA secara mekanis dan kimiawi melawan respon imun terhadap *S. aureus* termasuk menghambat fagositosis oleh leukosit maupun eradikasi bakteri oleh peptida anti-mikroba alami inang (Gambar 2.2). Selain itu PIA juga mengurangi penetrasi anti-mikroba sebagai akibat efek kationik (Gambar 2.2) dari polimer PIA yang melapisi biofilm (Arciola et al., 2015, Joo and Otto, 2015b, Vuong et al., 2004).

2.3. Identifikasi dan Penanganan Biofilm *Staphylococcus aureus*

2.3.1. Identifikasi biofilm

Sampai saat ini belum ada konsensus mengenai cara identifikasi biofilm pada penderita di fasilitas kesehatan. Umumnya identifikasi biofilm dilakukan secara *in vitro* setelah patogen dalam hal ini *S. aureus* berhasil diisolasi dari spesimen penderita. Teknik identifikasi biofilm secara *in vitro* atau yang dikenal sebagai *biofilm formation assay* menggunakan zat warna yang dapat mengikat komponen dari biofilm; misalnya kristal violet ataupun *congo red* untuk mewarnai sel bakteri, pewarnaan *lectin* (Sultan et al., 2021) untuk mewarnai komponen matriks ekstraseluler dari biofilm ataupun juga bisa menggunakan zat fluoresens yang mampu mengikat komponen DNA dari biofilm, baik itu DNA dalam nukleus bakteri (misal dengan Syto9) (Sultan et al., 2021), maupun ekstraseluler DNA dari biofilm dengan menggunakan pewarnaan propidium iodida (PI) (Sultan et al., 2019a, Sultan et al., 2021)

2.3.2. Penanganan biofilm

Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya, kebanyakan pengobatan antibiotik tidak efektif terhadap biofilm *S. aureus*. Lebih buruk lagi, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa pengobatan antibiotik malah dapat menginduksi pembentukan biofilm (Kaplan et al., 2012, Archer et al., 2011). Sampai saat ini, rifampisin adalah antibiotik yang paling efisien melawan biofilm *S. aureus* baik secara *in vitro* maupun *in vivo*; hal ini dikarenakan penetrasi rifampicin yang sangat baik dalam jaringan-jaringan termasuk jaringan tulang; dan menunjukkan efektifitas yang tinggi baik itu secara *in vitro* maupun *in vivo* (Maudsdotter et al., 2019, Marsot et al., 2020, Cluzel et al., 1984). Namun, penelitian-penelitian terbaru menunjukkan bahwa penggunaan rifampicin untuk terapi biofilm harus dilakukan secara hati-hati karena besarnya kemungkinan munculnya resistensi *S. aureus* terhadap antibiotik ini (Sultan et al., 2022, Campbell et al., 2001, Maudsdotter et al., 2019).

Terapi kombinasi antibiotik telah disarankan untuk mencegah timbulnya resistensi antibiotik. Di Prancis, antibiotik golongan β -*lactam* seperti oxacillin, cloxacillin, atau cefazolin direkomendasikan untuk pengobatan awal *S. aureus* terkait biofilm yang kemudian diikuti dengan pemberian ofloxacin dan rifampicin

(Burdet et al., 2018). Sayangnya, pengobatan kombinasi ini juga tetap tidak efektif terhadap kasus infeksi kronik, dan biasanya intervensi dengan pembedahan tetap diperlukan. Di Indonesia sendiri pengobatan biofilm *S. aureus* dengan menggunakan rifampicin masih menjadi perdebatan. Mengingat bahwa rifampicin merupakan salah satu komponen utama dalam pengobatan infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang penggunaannya harus setepat mungkin untuk mencegah penyebaran lebih lanjut strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampicin (Menzies et al., 2018, Svensson et al., 2020). Oleh karenanya, alternatif pengobatan biofilm *S. aureus* perlu segera ditemukan.

2.4. Tumbuhan Sebagai Alternatif Sumber Anti-mikroba

Jutaan tahun evolusi telah membantu tanaman mengembangkan sistem pertahanan yang mampu membantu resistensi tanaman terhadap serangan mikroba. Karenanya, ini menjadi pemicu sebagai dasar penelitian terhadap keberhasilan evolusi dari tanaman melawan mikroba. Dalam beberapa dekade terakhir, zat yang berasal dari alam telah menjadi pusat perhatian dari para peneliti di seluruh dunia. Sejauh ini, bahan alami yang berasal dari mikroba masih merupakan sumber terpenting bahan anti-mikroba dalam industri farmasi (Clardy et al., 2006, Piddock et al., 2010). Meskipun telah banyak penelitian yang mencoba melihat lebih dalam terhadap produk alami dari tanaman sebagai kandidat antibiotik, sejauh ini tidak banyak yang memberi harapan. Tumbuhan memiliki cara yang berbeda untuk bertahan terhadap serangan hama seperti jamur, bakteri dan virus. Mulai dari mekanisme pertahanan berupa produksi langsung bahan kimia (metabolit) untuk pertahanan diri (seperti phytoanticipins) ataupun juga melibatkan proses perubahan di tingkat gen untuk memproduksi serangkaian metabolit kimiawi sekunder yang bervariasi seperti senyawa polifenol.

2.4.1. Zat aktif dalam tumbuhan

Sebagian besar metabolit kimia yang diperoleh dari tanaman berupa polifenol, yang didefinisikan sebagai senyawa yang mengandung satu atau lebih cincin aromatik dengan setidaknya satu gugus hidroksil yang terikat (Zhou et al., 2016, Moga et al., 2016). Senyawa - senyawa polifenol ini dapat dibagi menjadi lima sub kelompok utama: flavonoid, lignan, asam fenolik, stilbenes, dan polifenol lainnya (Luca et al., 2020, Zhou et al., 2016). Secara umum, potensi terapeutik polifenol

berasal dari aktivitas anti-oksidatif dan anti-inflamasinya, yang melindungi sel-sel normal dari kerusakan, sehingga mencegah perkembangan penyakit (Cory et al., 2018). Polifenol juga mampu mempengaruhi sel abnormal melalui modulasi jalur sinyal yang terlibat dalam proliferasi, migrasi, angiogenesis, dan apoptosis (Zhou et al., 2016). Mekanisme molekuler yang mendasari kerja polifenol sangat beragam dan kompleks. Antara lain, polifenol menyebabkan penghambatan faktor transkripsi yang terkait dengan proses ini, seperti faktor regulasi gen NF- κ B. Fungsi utamanya menyangkut aktivasi peradangan dan dapat dipicu oleh rangsangan seperti stres oksidatif (Ramos, 2008, Khan et al., 2020). Walaupun efek anti oksidan dan efek anti-inflamasi dari senyawa-senyawa yang diisolasi dari tumbuhan telah banyak diketahui, namun penjelasan mengenai kemungkinan efek anti-mikroba dari senyawa-senyawa di atas masih sangat terbatas

Dalam hal efek anti-mikroba, penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa tunggal yang dihasilkan oleh tumbuhan umumnya tidak terlalu aktif dalam uji *in vitro* (Tegos et al., 2002). Metabolit ini hanya menunjukkan aktivitas anti-mikroba yang lemah atau sedang dengan konsentrasi penghambatan minimal (MIC) biasanya dalam kisaran 100-1000 μ g/mL, yaitu, jauh lebih besar jika dibandingkan dengan antibiotik yang diproduksi oleh bakteri dan jamur (MIC, 0,01–10 μ g/mL) (Tegos et al., 2002), kenyataan inilah yang menyebabkan kurangnya aplikasi klinis dari anti-mikroba yang berasal dari tumbuhan (Cowan, 1999). Penjelasan yang paling masuk akal mengenai hal tersebut di atas; bahwa tumbuhan tidak mengandalkan pada satu metabolit dalam pertahanannya melawan serangan mikroba, namun menggunakan kombinasi strategi dan sistem pertahanan yang efisien yang mencakup molekul yang sangat bervariasi, dari protein, H₂O₂ dan oksigen reaktif yang akan saling melengkapi dalam melawan serangan mikroba. Sistem pertahanan ini kemungkinan melibatkan aktivitas sinergis dari dua atau lebih metabolit (*compound*) yang bisa aktif melalui mekanisme yang berbeda terhadap satu target (Belofsky et al., 2006, Abreu et al., 2017). Uji interaksi sinergisme antara berbagai metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman dengan anti-mikroba yang tersedia saat ini mampu menunjukkan meningkatkan potensi atau aktivitas anti-mikroba yang dipasangkan. Banyak metabolit tumbuhan yang telah dilaporkan menunjukkan efek inhibisi pada sistem *efflux pump* dari bakteri-bakteri gram positif (Gibbons et al., 2004, Kang et al., 2011, Stavri et al., 2007, Jin et al., 2011, Gibbons et al., 2003) ataupun efek

penghambatan terhadap *penicillin-binding proteins (PBP)* termasuk PBP-2a yang berkaitan dengan sifat resistensi *S. aureus* terhadap antibiotik golongan β -lactam (Shimizu et al., 2001, Shiota et al., 2004).

2.4.2. Neobavaisoflavone

Neobavaisoflavone adalah senyawa isoflavon yang pertama disolasi dari *Psoralea corylifolia* L., memiliki efek anti-inflamasi, anti-oksidatif, dan osteogenik (Szliszka et al., 2011b, Don et al., 2012). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki efek anti-kanker (Ye et al., 2020). *Neobavaisoflavone* terbukti tidak hanya menurunkan viabilitas pada beberapa jenis sel kanker yang berbeda tetapi juga meningkatkan apoptosis pada sel yang resisten terhadap *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)* (Ye et al., 2020, Szliszka et al., 2011a, Kim et al., 2014). Selain itu, bukti bagaimana *isoflavone* mampu meningkatkan efektivitas kemoterapi kanker menunjukkan bahwa neobavaisoflavon juga dapat mempengaruhi aktivitas beberapa obat (Sahin et al., 2019).

Walaupun studi *in vitro* dan *ex vivo* telah menunjukkan bahwa fraksi zat aktif dari buah, biji dan akar dari tanaman *P. corylifolia* menunjukkan efek anti mikroba dalam hal ini anti-dermatofita (Rajendra Prasad et al., 2004), studi mengenai efeknya terhadap bakteri sejauh ini masih sangat minim. Penelitian kami sebelumnya yang melihat pada efek anti-mikroba dari 22 jenis senyawa flavonoid yang juga ditemukan pada tanaman ini, menunjukkan bahwa metabolit *neobavaisoflavone* memiliki efek anti-mikroba terbaik terhadap *S. aureus* dengan *minimal inhibitory concentration (MIC)* di bawah 120 μ g/mL (Abreu et al., 2017) pada aplikasi. Pemeriksaan lebih lanjut dengan mengombinasikan neobavaisoflavone dengan ciprofloxacin menunjukkan sinergisme *in vitro* yang cukup baik terhadap *Staphylococcus aureus* yang multi resisten, dengan nilai *Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI)* pada angka 0.5 (Abreu et al., 2017). Oleh karena itu studi lebih lanjut tentang efek anti-biofilm dari senyawa ini perlu dilakukan mengingat urgensi dari ketiadaan anti-biofilm di fasilitas kesehatan saat ini.

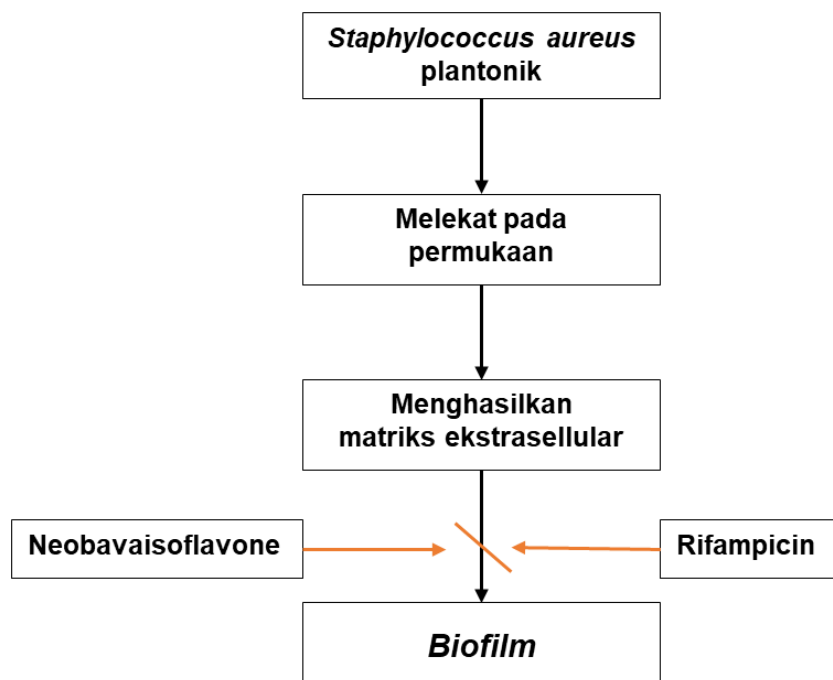
2.5. Uji hambat pembentukan biofilm

Meskipun biofilm *S. aureus* menunjukkan kemampuan adaptasi yang luar biasa terhadap pemberian antibiotik, sayangnya sejauh ini belum ada antibiotik yang digunakan sebagai standar pengobatan terhadap biofilm *S. aureus*. Selain itu, berbeda dengan uji konsentrasi penghambatan minimal standar untuk menilai aktivitas anti-bakteri terhadap sel planktonik, tidak ada metode baku untuk mengevaluasi uji hambat suatu obat atau senyawa terhadap pembentukan biofilm (Haney et al., 2021).

Secara konvensional, jumlah sel bakteri dalam suatu suspensi dapat diperkirakan dengan menggunakan metode kuantifikasi optik yang mengukur kepadatan sel bakteri, sehingga dimungkinkan standarisasi jumlah sel bakteri yang akan diuji. Namun, biofilm dikenal heterogen dalam komposisi mereka dan sangat dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan dan lingkungan mereka (Haney et al., 2018). Oleh karena itu, jumlah sel bakteri dalam biofilm tidak dapat distandarisasi dengan cara yang sama untuk konsentrasi penghambatan minimal (MIC) (Wiegand et al., 2008). Pewarnaan kristal violet dari biofilm yang terbentuk di dalam sumur pelat mikrotiter atau di atas permukaan abiotik adalah metode kuantitatif yang paling umum digunakan untuk menganalisis pembentukan ataupun penghambatan biofilm. Uji biofilm dengan kristal violet mungkin yang paling dikenal di penelitian mikroba sebagai pewarna utama yang digunakan dalam pewarnaan Gram yang membedakan antara Gram negatif dan Gram positif bakteri (Haney et al., 2018, Haney et al., 2021). Pewarnaan kristal violet telah lazim dalam penelitian biofilm karena biayanya yang rendah dan kemudahan aplikasinya. Metode ini bergantung pada penggunaan pewarnaan kristal violet untuk mengukur biofilm yang melekat sebagai biomassa di dalam sumur pelat mikrotiter (Haney et al., 2018). Uji penghambatan biofilm dinilai dengan menambahkan senyawa atau metabolit yang ingin diuji secara bersamaan dengan penambahan suspensi bakteri dan selanjutnya diinkubasi untuk durasi waktu yang telah ditentukan. Langkah selanjutnya diikuti dengan kuantifikasi biomassa yang melekat pada permukaan pelat dengan pewarnaan kristal violet. Kapasitas penghambatan biofilm dari peptida atau antimikroba dapat kemudian dinilai dengan memeriksa kurva dosis-respons pewarnaan kristal violet menurut konsentrasi senyawa yang diujikan (Haney et al., 2018, Haney et al., 2021).

Beberapa pewarna kolorimetri lainnya telah digunakan untuk mengukur biofilm yang melekat dalam pelat mikrotiter seperti safranin (Ommen et al., 2017), dimetil metilen blue (Tote et al., 2008) atau FMTM1-43 dye (*N*-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium Dibromide) (Tote et al., 2008), tetapi teknik-teknik ini belum diadopsi secara luas dalam penelitian biofilm. Saat ini, kuantifikasi biofilm dengan menggunakan teknik fluoresensi juga telah mulai digunakan dengan pertimbangan bahwa teknik pewarnaan dengan kristal violet tidak dapat diaplikasikan pada matriks ekstraseluler dari biofilm (Sultan et al., 2021). Walaupun belum luas digunakan namun teknik ini mampu membantu menilai viabilitas dari bakteri yang terdapat di dalam biofilm sehingga memungkinkan menilai keefektifan senyawa yang diuji secara langsung (Sultan et al., 2021). Alat skrining biofilm lainnya ada, termasuk: pemindaian laser *confocal microscope* (Navarro et al., 2014, Bridier et al., 2010, Sultan et al., 2019a) maupun dengan menggunakan teknik pengukuran tingkat metabolisme sel bakteri dalam biofilm dengan menggunakan mikrokalorimeter (Sultan et al., 2022), tetapi ini membutuhkan peralatan yang mahal atau khusus yang mungkin tidak tersedia di setiap laboratorium.

2.6. Kerangka Pikir



Gambar 2.3 Kerangka Pikir