

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroba Patogen Vagina

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh patogen, yang menyerang jaringan tubuh dan menyebabkan kerusakan (Bannister *et al.*, 2006). Patogena adalah mikroorganisme yang mampu menyebabkan penyakit. (Jawetz, 2004). Mikroba patogen dalam tubuh di antaranya yaitu: *Neisseria gonorrhoeae*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus mulieri*, *Mobiluncus curtisii*, *Candida sp.* (Kayser *et al.*, 2005).

2.1.1 *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae adalah gram negatif diplococcus selektif aerob dan fakultatif anaerob yang tumbuh dengan sangat baik pada suhu 35-36°C pada media diperkaya (seperti agar-agar coklat) yang mengandung hemoglobin dan berbagai nutrisi lainnya, pada suasana lembab, mengandung setidaknya 3% CO₂. Karakteristik koloni kecil, bulat, abu-abu berkilau dan non hemolitik pada agar darah setelah 24 jam inkubasi (Brachman & Abrutyn, 2009).

Neisseria gonorrhoeae adalah organisme penyebab gonore. Beberapa strain mengandung proyeksi permukaan yang disebut pili. Organisme dengan pili dapat terikat ke epitel uretra dan menyebabkan penyakit (Tan *et al.*, 2008). *Neisseria gonorrhoeae* adalah organisme peka yang tidak

dapat bertahan lama di luar tubuh. Spesimen dari uretra laki-laki dapat diperoleh dengan menggunakan loop platinum (Bannister *et al.*, 2006).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah gram positif coccus non motil, tidak berkapsul, tidak membentuk spora coccus, tunggal maupun berpasangan, rantai pendek, atau berkelompok. Ciri-ciri tampilannya seperti "sekelompok anggur". *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri fakultatif anaerob tetapi tumbuh lebih baik pada keadaan aerob dibandingkan pada keadaan anaerob dan mudah tumbuh pada agar darah dan coklat.

Koloni *Staphylococcus aureus* berukuran 1-3 mm, menghasilkan pigmen kuning emas karena adanya karotenoid. Kebanyakan spesies lain tidak berpigmen. Sebagian besar strain *Staphylococcus aureus* menghasilkan hemolisis dalam waktu 24 sampai 36 jam pada media agar darah. *Staphylococcus aureus* biasanya menghasilkan katalase dan memfermentasikan glukosa (Brachman & Abrutyn, 2009).

2.2 Anti bakteri

Anti bakteri adalah senyawa organik sintetik atau terdapat secara alami yang dapat menghambat atau merusak bakteri tertentu, biasanya pada konsentrasi rendah. Aktivitas antibakteri diukur *in vitro* untuk menentukan: (1) potensi agen antibakteri dalam larutan, (2) konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan, dan (3) kerentanan mikroorganisme tertentu terhadap obat dengan konsentrasi tertentu (Jawetz *et al.*, 2004).

Obat-obatan sintetis yang digunakan untuk terapi penyakit infeksi menjadi perhatian karena keamanan obat masih menjadi isu global. Sebagian besar obat-obatan sintetis menyebabkan efek samping dan sebagian besar mikroba sudah resisten terhadap obat sintetis. Oleh karena itu, eksplorasi senyawa antibakteri dari sumber alami mendapatkan perhatian lebih banyak. Obat dari sumber alami tersebut mempunyai sedikit efek samping dan potensi terapi yang baik untuk mengobati penyakit infeksi (Chanda & Rakholiya, 2011).

2.2.1. Jamur Tiram sebagai Anti bakteri

Pleuroteaceae (Basidiomycetes) adalah jamur tiram yang secara luas didistribusikan ke seluruh Asia, termasuk Jepang. Jamur tiram pertama kali dijelaskan secara ilmiah pada 1775 oleh naturalis Belanda Nikolaus Joseph Freiherr von Jacquin (1727-1817) dan bernama *Agaricus ostreatus*. Spesies *Pleurotus* terkenal dan banyak dibudidayakan di seluruh dunia terutama di Asia dan Eropa karena teknologi produksi yang sederhana, ekonomis dan tinggi efisiensi biologi.

Spesies *Pleurotus* pendegradasi lignin secara efisien dapat tumbuh di berbagai limbah pertanian dengan kemampuan beradaptasi yang baik dan kondisi agroklimat yang bervariasi. *Pleurotus* dibudidayakan pada berbagai macam produk perkebunan untuk produksi pakan, enzim, dan produk obat. Spesies *Pleurotus* adalah sumber yang kaya protein, mineral (Ca, P, Fe, K dan Na) serta vitamin C dan B kompleks (tiamin, riboflavin, asam folat dan niasin).

Spesies *Pleurotus* mempunyai nilai gizi dan kualitas unggul karena adanya semua asam amino esensial. *Pleurotus* sp. mengandung tinggi kalium sehingga jamur merupakan makanan ideal untuk pasien penderita hipertensi dan penyakit jantung. Ekstrak etanol spesies *Pleurotus* berhasil diterapkan dalam pengembangan agen antibakteri yang lebih ampuh dan efisien (Senthilkumar, 2015).

Beberapa penelitian tentang sifat obat pada ekstrak dari spesies anggota genus *Pleurotus* telah dilaporkan. Termasuk sifat antitumor yang disebabkan polisakarida (Wandati *et al.*,2013), antigenotoksik, aktivitas bio antimutagen (Fillipie & Umek,2002), aktivitas anti inflamasi, anti lipidemia, anti hipertensi, aktivitas anti hiperglikemia (Hu *et al.*,2006), aktivitas anti jamur dan anti bakteri (Nehra *et al.*,2012) dalam Senthilkumar, 2015. Owaid *et al.* (2015) melaporkan bahwa filtrat dari *Pleurotus flabellatus* mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan filtrat *P. ostreatus* (abu-abu), *P. ostreatus* (putih) dan *P. cornucopiae* (kuning).

Klasifikasi jamur tiram merah muda adalah sebagai berikut (NCBI, 2016):

Super kingdom	: Eukariota
Kingdom	: Fungi
Divisi	: Basidiomycota
Kelas	: Agaricomycetes
Ordo	: Agaricales

Famili : Pleurotaceae
Genus : *Pleurotus*
Spesies : *Pleurotus flabellatus*



Gambar 1. *Pleurotus flabellatus* (Anonim, 2013)

Banyak komponen biologi aktif yang diisolasi dari jamur termasuk hemiselulosa, polisakarida, lipopolisakarida, peptida protein, glikoprotein, lektin, lipid, triterpenoid (Patel *et al.*, 2012), vitamin C, vitamin E, flavonoid dan senyawa fenolik (Jayakumar *et al.*, 2011).

2.2.2. Mekanisme Penghambatan

Prastiyanto (2016) melaporkan bahwa berdasarkan hasil reaksi penampak bercak ekstrak *Pleurotus flabellatus* pada lempeng KLT mengandung senyawa golongan terpenoid. Hasil ini sesuai dengan penelitian Jayakumar *et al.* (2011) bahwa jamur tiram menghasilkan metabolit sekunder berupa terpenoid. Senyawa terpenoid merupakan

senyawa metabolit sekunder yang paling melimpah dengan struktur bervariasi.

Mekanisme aktivitas antibakteri senyawa terpenoid masih belum diketahui, namun menurut Bontjura *et al.* (2015), senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak membran sitoplasma dan dinding sel bakteri. Hal ini mengakibatkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel, sehingga sel menjadi lisis. Terpenoid juga akan mengganggu proses transport ion penting dalam sel bakteri yang dapat menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel sehingga proses difusi bahan atau zat yang dibutuhkan oleh bakteri juga terpengaruh (Sugianitri, 2011). Menurut Rahmawati (2011), terpenoid dapat bereaksi dengan porin (protein trans membran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat, merusak porin dan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi kemudian pertumbuhan bakteri terhambat atau bakteri mati.

2.3 Metode Perusakan Sel

2.3.1. Blender

Metode ini sangat ideal untuk merusak jaringan mamalia atau tumbuhan dengan gaya potong. Jaringan dipotong kecil-kecil dan dicampur dengan adanya larutan penyangga (*buffer*) selama sekitar 1 menit untuk merusak jaringan, kemudian disentrifugasi untuk menghilangkan kotoran. Metode ini tidak sesuai untuk bakteri dan ragi,

tetapi *blender* dapat digunakan untuk mikroorganismenya ini jika sedikit manik-manik kaca dimasukkan untuk menghasilkan benturan. Sel terjebak antara manik-manik yang berbenturan dan secara fisik terganggu oleh gaya potong (Wilson & Walker, 2010).

2.3.2. Menumbuk dengan Keras

Menumbuk dalam mortar dan alu dengan adanya pasir atau alumina dan sedikit *buffer* adalah metode yang berguna untuk merusak sel-sel bakteri atau tumbuhan; dinding sel secara fisik robek dengan kasar. Namun, metode ini sesuai untuk menangani sampel yang relatif kecil. *Dynomill* adalah versi mekanik skala besar untuk pendekatan ini. *Dynomill* terdiri dari ruang yang berisi manik-manik kaca dan sejumlah cakram *impeller* yang berputar. Sel pecah ketika terjebak di antara manik-manik yang berbenturan. Sebuah model laboratorium skala 600 cm³ dapat memproses 5 kg bakteri per jam (Wilson & Walker, 2010).

2.3.3. Tekanan

Penggunaan tekanan seperti *France Press*, atau *Manton-Gaulin Press* adalah versi skala besar yang sangat baik untuk merusak sel-sel mikroba. Suspensi sel (50 cm³) yang ditekan oleh pompa jenis piston pada tekanan tinggi (10.000 PSI=1 bfin. ⁻²≈1450 kPa) melalui lubang kecil. Kerusakan terjadi karena gaya potong ketika sel ditekan melalui lubang kecil juga oleh penurunan kecepatan tekanan ketika sel-sel muncul dari lubang kecil sehingga memungkinkan sel pecah dengan efektif. Metode ini memerlukan beberapa cara untuk melisiskan semua sel, tetapi pada kondisi yang

terkendali dapat memungkinkan untuk melepaskan protein secara selektif dari ruang periplasma. *X-Press* dan *Hughes Press* adalah variasi pada metode ini; sel ditekan melalui lubang kecil sebagai pasta beku, seringkali dicampur dengan penggosok. Kristal es dan bantuan penggosok tersebut dapat merusak dinding sel (Wilson & Walker, 2010).

2.3.4. Metode Enzimatik

Enzim lizozim diisolasi dari putih telur ayam, dapat memecah peptidoglikan. Dinding sel peptidoglikan dapat dibuang dari bakteri gram positif dengan perlakuan lizozim. Apabila dilakukan dalam *buffer* yang sesuai setelah dinding sel diberi perlakuan, membran sel akan pecah karena efek osmotik penghentian *buffer*.

Bakteri gram negatif dapat terganggu oleh lizozim tetapi perlakuan dengan EDTA (untuk melepaskan Ca^{2+} sehingga menurunkan stabilitas lapisan lipopolisakarida luar) dan penambahan deterjen non-ionik untuk melarutkan membran sel. Permeabilitas membran luar yang baik tersebut memungkinkan akses lizozim masuk ke dalam peptidoglikan. Apabila dilakukan dalam media isotonik sehingga membran sel tidak rusak, dapat melepaskan protein secara selektif dari ruang periplasma (Wilson & Walker, 2010).

2.3.5. Metode Sonikasi

Metode ini sangat ideal untuk suspensi kultur sel atau sel mikroba. Sebuah *probe* sonikator diturunkan ke dalam suspensi sel dan menghasilkan gelombang suara frekuensi tinggi (> 20kHz) selama 30-60

detik. Gelombang suara ini menyebabkan gangguan sel dengan gaya geser dan kavitasi. Kavitasi merujuk pada daerah di mana ada tekanan silang dan penjernihan dengan pertukaran cepat. Gelembung gas di dalam *buffer* yang awalnya di bawah tekanan, karena terdekompresi sehingga melepaskan gelombang kejut dan merusak sel. Metode ini cocok untuk volume yang relatif kecil (50-100 cm³). Sampel harus disimpan di atas es selama perlakuan karena panas yang dihasilkan cukup besar (Wilson & Walker, 2010).

2.4 Teknik Pemisahan Protein

2.4.1 *Ion Exchange Chromatography*

Metode ini memisahkan protein berdasarkan muatan ion permukaan menggunakan resin yang dimodifikasi dengan senyawa kimia yang bermuatan positif atau bermuatan negatif. Sebagian besar protein memiliki muatan negatif atau positif tergantung pada Titik Isoelektrik (TI) pada pH tertentu, yang memungkinkan untuk berinteraksi dengan muatan lawan matriks kromatografi. Apabila pH protein bermuatan positif di bawah nilai TI, protein akan terikat ke penukar kation, ketika pH protein bermuatan negatif di atas nilai TI maka protein akan terikat ke penukar anion.

Ion exchange chromatography adalah salah satu teknologi yang menggunakan prinsip kromatografi pertukaran ion. Alat tersebut menggunakan teknologi membran-absorben sebagai matriks kromatografi untuk memisahkan protein. Membran absorben di kolom berbasis selulosa stabil dengan struktur yang sangat berpori sehingga memudahkan protein

masuk dengan mudah ke permukaan yang bermuatan. Interaksi antara molekul dan situs aktif pada membran terjadi melalui pori konvektif. Oleh karena itu, membran adsorptif memiliki potensi untuk mempertahankan efisiensi tinggi ketika memurnikan biomolekul besar dengan difusi rendah (S. C. Tan & Yiap, 2009).

2.4.2 *Gel Filtration Chromatography*

Gel Filtration Chromatography, juga disebut *gel permeation chromatography*, memisahkan protein berdasarkan ukuran dan bentuk molekul dan molekul tidak terikat ke media kromatografi. Prinsip teknik ini adalah molekul besar melewati kolom lebih cepat daripada molekul kecil. Molekul kecil dapat masuk ke lubang kecil matriks dan akses lebih ke kolom. Protein berukuran kecil akan melewati lubang-lubang tersebut dan membutuhkan lebih banyak waktu untuk keluar dari kolom dibandingkan dengan protein berukuran besar yang tidak dapat masuk ke lubang-lubang tetapi keluar secara langsung dari kolom melalui ruang kosong di kolom. Keuntungan dari *Gel Filtration Chromatography* adalah sesuai untuk biomolekul yang mungkin sensitif terhadap perubahan pH, konsentrasi ion logam, dan kondisi lingkungan (S. C. Tan & Yiap, 2009).

2.4.3 *Affinity Chromatography*

Affinity Chromatography tergantung pada interaksi yang spesifik antara protein dan fase padat untuk melakukan pemisahan dari kontaminan. Terdiri dari langkah yang sama seperti *Ion exchange chromatography*. Hal ini memungkinkan pemurnian protein pada fungsi

biologis dasar atau struktur kimia individu. Protein yang memiliki afinitas tinggi menuju kelompok kimia spesifik ketika ligan kovalen akan menempel dan terikat ke matriks kolom sementara protein lain melewati kolom. Elektrostatik atau interaksi hidrofobik, tekanan *van der Waals'* dan ikatan hidrogen adalah interaksi biologis antara ligan dan molekul protein target. Protein yang terikat akan dielusi keluar dari kolom oleh larutan yang mengandung ligan konsentrasi tinggi (S. C. Tan & Yiap, 2009).

2.4.4 Southwestern Blotting (Immunoblotting)

Southwestern Blotting (Immunoblotting) adalah metode yang digunakan untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan mengkaracteristikan protein pengikat DNA oleh kemampuannya dalam mengikat oligonukleotida *probe* spesifik. Banyak protein pengikat DNA pada sel perlu diisolasi secara individu dan dikarakterisikkan untuk mendefinisikan fungsi gen. Ada tiga langkah yang terlibat dalam metode ini. Pertama, ekstrak inti protein dipisahkan oleh elektroforesis SDS-PAGE. Selanjutnya, protein yang terpisah ditransfer ke filter nitroselulosa, *polyvinylidene difluoride* (PVDF) atau membran nilon kation. Filter kemudian diinkubasi dengan probe oligonukleotida untuk menganalisis protein yang terserap. Namun, teknik ini terbentur masalah seperti banyak jumlah inti protein yang diperlukan (biasanya 50-100 mg), degradasi protein selama isolasi, melakukan pemisahan elektroforesis yang efisien dan transfer protein berbagai ukuran molekul (S. C. Tan & Yiap, 2009).

2.4.5 Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik untuk memisahkan molekul dalam campuran akibat pengaruh medan listrik. Molekul terlarut dalam medan listrik bergerak atau bermigrasi pada kecepatan yang ditentukan oleh perbandingan massa. Sebagai contoh, jika dua molekul memiliki massa dan bentuk yang sama, molekul dengan beban yang lebih besar akan bergerak lebih cepat menuju elektroda (Lodish *et al.*, 2013).

2.4.5.1 Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel (SDS-PAGE)

Electrophoresis

Pemisahan elektroforesis protein yang paling umum adalah gel poliakrilamida. Ketika campuran protein diterapkan pada gel dan arus listrik diterapkan, protein kecil bermigrasi lebih cepat melalui gel protein yang lebih besar.

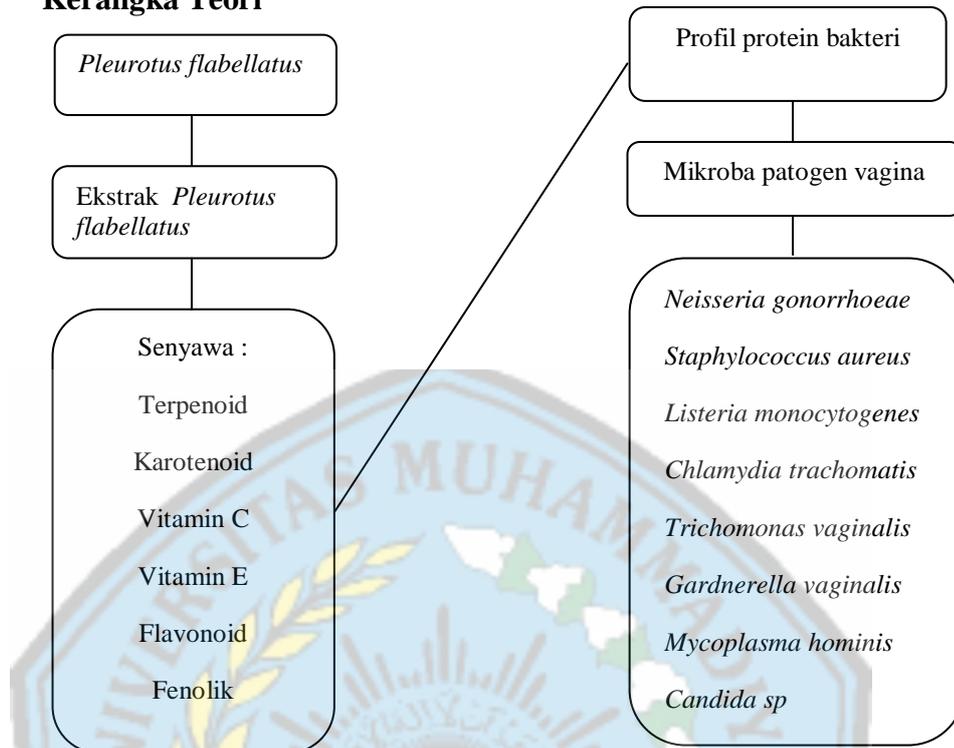
Gel dimasukkan antara sepasang pelat kaca dengan polimerisasi larutan monomer akrilamida ke dalam rantai poliakrilamida dan sekaligus garis silang rantai dalam matriks semipadat. Ukuran pori gel dapat bervariasi dengan menyesuaikan konsentrasi poliakrilamida dan garis silang reagen. Tingkat di mana protein bergerak melalui gel dipengaruhi oleh ukuran pori-pori gel dan kekuatan medan listrik. Dengan mengatur parameter yang sesuai ini, protein dari berbagai ukuran dapat dipisahkan.

Dalam teknik yang paling kuat untuk menyelesaikan protein campuran, protein yang terkena SDS –PAGE sebelum dan selama elektroforesis gel. SDS mendenaturasi protein, menyebabkan protein multimerik terpisah ke

dalam subunit dan semua rantai polipeptida tertekan ke dalam konformasi yang diperpanjang dengan beban yang sama: rasio massa. Perlakuan SDS sehingga menghilangkan efek perbedaan bentuk dan rantai panjang yang berhubungan dengan massa, adalah satu-satunya penentu tingkat migrasi protein dalam penentuan elektroforesis SDS-poliakrilamida. Bahkan rantai yang berbeda pada berat molekul yang kurang dari 10 persen dapat dipisahkan dengan teknik ini. Selain itu, berat molekul protein dapat diperkirakan dengan membandingkan jarak migrasi melalui gel dengan jarak protein dengan berat molekul yang diketahui bermigrasi (Lodish *et al.*, 2013).



2.5 Kerangka Teori



2.6 Kerangka Konsep

