

Pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus aureus* pada Penambahan Glukosa dan Sukrosa

Yuda Dwi Prakoso, Reza Hakim, Rio Risadiansyah *
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA)

ABSTRAK

Pendahuluan: *Staphylococcus aureus* adalah salah satu infeksi bakteri yang merupakan agen penyebab infeksi multipel pada manusia. *Staphylococcus aureus* membentuk struktur kompleks biofilm polimer ekstraseluler yang menyediakan lingkungan yang fungsional untuk pembentukan mikrokoloni, pemeliharaannya, dan rekolonisasi sel sessile setelah penyebarannya. Untuk pengujian antibiofilm, diperlukan produksi biofilm yang memadai yang dipengaruhi oleh perbedaan media tumbuh. Penelitian ini akan membandingkan produksi biofilm oleh *S. aureus* pada media TSB dibandingkan BHI dan juga membandingkan produksi biofilm oleh *S. aureus* pada penambahan glukosa atau sukrosa

Metode: Penelitian ini adalah penelitian ekperimental *in vitro* dengan empat replikasi biologis dan tiga replikasi teknis. Produksi biofilm diukur menggunakan metode pewarnaan kristal violet pada 96 well plate. Media yang digunakan adalah media Brain Heart Infusion (BHI) dan Tryptone Soya Broth (TSB) dengan dan tanpa penambahan 5% (b/v) glukosa dan sukrosa. Inkubasi untuk pembentukan biofilm dilakukan selama 24 jam, dan biofilm dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 560 nm. Hasil dianalisa menggunakan multiple t.test, dengan nilai $p < 0.05$ dianggap signifikan.

Hasil: Produksi biofilm pada media BHI dan TSB adalah sebesar $0,22 \pm 0,069$ dan $0,19 \pm 0,073$. Pada penambahan glukosa 5%, produksi biofilm BHI sebesar $0,26 \pm 0,75$ dan TSB sebesar $0,22 \pm 0,05$. Pada penambahan sukrosa 5%, produksi biofilm BHI sebesar $0,28 \pm 0,91$ dan TSB sebesar $0,24 \pm 0,061$. Berdasarkan hasil pengujian statistik, produksi biofilm antara BHI dan TSB tidak bernilai signifikan, dan penambahan glukosa serta sukrosa tidak bernilai signifikan.

Kesimpulan: Media BHI dan TSB memiliki kemampuan yang sama dalam produksi biofilm, dan penambahan glukosa maupun sukrosa tidak mempengaruhi produksi biofilm.

Kata Kunci: Biofilm, *Staphylococcus aureus*, Optimasi media

*Korespondensi:

Rio Risadiansyah

Jl, MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

email : riorisadiansyah@unisma.ac.id

Formation of Biofilm on *Staphylococcus aureus* on the Addition of Glucose and Sucrose

Yuda Dwi Prakoso, Rio Risadiansyah, Reza Hakim *
Faculty of Medicine Universitas Islam Malang (UNISMA)

ABSTRACT

Background: *Staphylococcus aureus* is a bacterial infection which is the causative agent of multiple infections in humans. *Staphylococcus aureus* forms a complex structure of polymeric extracellular biofilms that provide a functional environment for microcolony formation, maintenance, and sessile cell recolonization after dispersal. For anti-biofilm testing, adequate biofilm production is required which is affected by differences in growing media. This study will compare biofilm production by *S. aureus* on TSB media compared to BHI and also compare biofilm production by *S. aureus* on the addition of glucose or sucrose.

Method: This study is an *in vitro* experimental study with four biological replications and three technical replications. Biofilm glucose and sucrose. Incubation for the formation of biofilms was carried out for 24 hours, and the biofilms were read with a spectrophotometer with a wavelength of 560 nm. The results were analyzed using multiple t.test, with a p value < 0.05 considered significant.

Results: Biofilm production on BHI and TSB media was 0.22 ± 0.069 and 0.19 ± 0.073 respectively. At the addition of 5% glucose, BHI biofilm production was 0.26 ± 0.75 da TSB was 0.22 ± 0.05 . At the addition of 5% sucrose, the production of BHI biofilm was 0.28 ± 0.91 and TSB was 0.24 ± 0.061 . Based on the statistical test results, the biofilm production between BHI and TSB was not significant, and the addition of glucose and sucrose was not significant.

Conclusion: BHI and TSB media have the same ability in biofilm production, and the addition of glucose or sucrose does not affect biofilm production.

Keywords: Biofilm, *Staphylococcus aureus*, Media optimization *Correspondence:

Rio Risadiansyah

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

e-mail : riorisadiansyah@unisma.ac.id phone: (0341) 55895

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus adalah salah satu infeksi bakteri yang merupakan agen penyebab infeksi multipel pada manusia seperti bakteremia, endokarditis infeksi, infeksi kulit (misalnya, impetigo, folikulitis, furunkel, karbunkel, selulitis, dan lain-lain), osteomyelitis, septic arthritis, infeksi paru (misalnya, pneumonia dan empiema), gastroenteritis, meningitis, sindrom syok toksik, dan infeksi saluran kemih.¹

Staphylococcus aureus membentuk struktur kompleks biofilm polimer ekstraseluler yang menyediakan lingkungan yang fungsional untuk pembentukan mikrokoloni, pemeliharaannya, dan rekolonisasi sel sessile setelah penyebarannya. Biofilm *Staphylococcus aureus* melindungi sel dari kondisi yang tidak bersahabat seperti perubahan suhu, keterbatasan nutrisi dan dehidrasi, dan juga melindungi sel dari obat antibakteri. Obat semakin menjadi tidak aktif sebagian atau seluruhnya terhadap *S. aureus* karena obat tersebut kurang dapat ditembus atau sama sekali tidak dapat ditembus karena adanya biofilm yang mengelilingi sel bakteri.² Meningkatnya toleransi terhadap antibiotik ini telah berkontribusi pada munculnya dan munculnya resistensi antimikroba (AMR), masalah serius yang mengakibatkan peningkatan morbiditas dan mortalitas.³

Biofilm dapat terbentuk di berbagai macam jenis permukaan, termasuk jaringan hidup, alat medis, saluran perairan industri maupun pada pipa air minum yg dialirkan ke perumahan.⁴ *Staphylococcus aureus* cenderung juga menginfeksi perlengkapan medis yang mengalami kontak dan merupakan penyebab umum dari infeksi nosocomial.⁵

Mencegah perkembangan biofilm *S. aureus* dikaitkan dengan empat fase, yaitu *adherence* atau perlekatan, proliferasi (pembentukan mikro-koloni), maturasi dan penyebaran.⁶ Pada fase *adherence* pencegahan dapat dilakukan dengan memodifikasi dari permukaan dengan agen antimicrobial atau antibiofilm.⁷ Contohnya dengan menggunakan *Phage K* untuk Contohnya dengan menggunakan *Phage K* untuk mengurangi biomassa biofilm pada *Staphylococcus aureus*. *Phage K* beserta 6 turunannya yang termodifikasi dapat mengurangi biomassa biofilm *S. aureus* tetapi metode ini mempunyai kelemahan, yaitu beberapa strain dari *Staphylococcus aureus* mempunyai resistensi terhadap *phage* ini akibatnya dibutuhkan penambahan adonan berasal *phage* yang termodifikasi, yang bisa bekerja hanya jika *Staphylococcus aureus* membuat biofilm multispesies. Penggunaan *phage* juga bukan penggunaan senyawa yg umum buat dilakukan sehari-hari.⁶

Metode *golden standard* yang dilakukan untuk menguji kemampuan biofilm adalah menggunakan microplate assay.⁸ Produksi dari biofilm ditentukan dari jenis bakteri dan juga jenis media yang digunakan. Optimasi produksi biofilm perlu dilakukan pada masing-masing bakteri sebelum dilakukan pengujian berikutnya. Pada penelitian ini, akan dilakukan perbandingan beberapa jenis media optimasi dan juga

jenis sumber karbohidrat (glukosa dan sukrosa) dalam produksi biofilmnya.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juli sampai Agustus 2022 di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Universitas Islam Malang. Penelitian ini adalah eksperimen laboratorium *in vitro* menggunakan bakteri *S. aureus* non-patogenik didapatkan dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Kedokteran Universitas Islam Malang dan sudah teridentifikasi bahwa bakteri tersebut adalah *S. aureus*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* dengan desain penelitian analitik kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan produksi biofilm oleh *S. aureus* pada media TSB dibandingkan BHI dan perbandingan produksi biofilm oleh *S. aureus* pada penambahan glukosa atau sukrosa

Pengujian *In vitro Staphylococcus Aureus*

Sampel *Staphylococcus Aureus* adalah hasil isolasi yang dilakukan oleh Rio Risandiansyah yang tidak dipublikasikan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNISMA dari sampel permukaan meja dan diidentifikasi morfologi biofilm bakteri pada media TSB dan BHI serta pewarnaan Gram

Pembuatan Media

Menyiapkan media Nutrient Broth sesuai ulangan yang dilakukan (Untuk 2 ulangan, siapkan 2 media) dengan volume minimal 5 ml di dalam erlenmeyer 50 ml. Menyiapkan media Nutrient Broth steril untuk pengenceran dengan volume 20 ml. Menyiapkan media Brain Heart Infusion + 5% Sukrosa steril sesuai ulangan yang dilakukan (untuk 2 ulangan, siapkan 2 media) dengan volume minimal 10 ml lalu menyiapkan media Brain Heart Infusion + 5% Sukrosa steril untuk kontrol media tanpa bakteri (volume minimal 1 ml). Dari cawan petri dengan isolat bakteri, menginokulasikan 3 - 5 koloni bakteri ke dalam 3 - 5 ml Nutrient Broth dan di inkubasi pada suhu 37°C dengan shaking overnight, memindahkan 1 ml media ke dalam kuvet dan catat OD600 menggunakan spektrofotometer lalu melakukan pengenceran hingga OD600 = 0.05

Memindahkan 100 ul ke dalam 10ml media BHI+2% Sukrosa. Dari suspensi bakteri 1:100, memindahkan 100 ul ke 96 well plate menggunakan mikropipet. Sisakan beberapa sumuran (1 kolom) untuk kontrol media. Pada kolom kontrol media, mengisi dengan 100 ul media BHI+5% Sukrosa. Apabila dilakukan pengujian antibiofilm untuk pencegahan pembentukan biofilm, masukkan sampel uji dengan konsentrasi yang diujikan. Pertahankan konsentrasi akhir per sumuran 100 - 120 ul. Apabila tidak melakukan pengujian antibiofilm untuk pencegahan pembentukan Apabila dilakukan pengujian antibiofilm untuk penghancuran biofilm yang terbentuk, masukkan

sampel uji dengan konsentrasi yang diujikan. Biarkan di suhu ruang dengan waktu uji (10 menit).

Apabila tidak melakukan pengujian antibiofilm untuk destruksi atau penghancuran biofilm, langkah ini dapat dilompati. Tutup well plate dan inkubasi selama 24 jam. Apabila dilakukan pengujian antibiofilm untuk penghancuran biofilm yang terbentuk, masukkan sampel uji dengan konsentrasi yang diujikan. Biarkan di suhu ruang dengan waktu uji (10 menit).

Pewarnaan/Staining Biofilm

Semua langkah dilakukan pada suhu ruang. Setelah inkubasi, menghilangkan semua sel planktonik (yang tidak terikat/ tidak membentuk biofilm) dengan cara membalikkan well plate di atas waste tray lalu membilas wellplate dengan merendam di dalam rinsing tray yang berisi air. Memastikan air masuk ke sumuran dengan cara mengosok wellplate dengan tangan (menggunakan sarung tangan). Setelah terbilas, wellplate dibalik di permukaan kain/ tissue untuk menghilangkan air tersisa lalu, Langkah tersebut di ulang. Menghilangkan air sebanyak mungkin dan membalikkan di atas paper towel. Pipet 125 μ l 0.1% kristal violet ke dalam semua sumuran di wellplate lalu biarkan selama 10 menit. membalik well plate di atas waste tray dan membilas wellplate dengan merendam di dalam rinsing tray yang berisi air. memastikan air masuk ke sumuran dengan cara mengosok wellplate dengan tangan (menggunakan sarung tangan).

Setelah terbilas, balik wellplate tersebut di permukaan kain/ tissue untuk menghilangkan air tersisa. Setelah itu mengulangi langkah tersebut lalu menghilangkan air sebanyak mungkin dan membalikkan di atas paper towel dan membiarkan wellplate untuk mengering selama overnight sebelum langkah kuantifikasi.

Kuantifikasi Biofilm

Memasukkan 150 μ l 95% etanol ke setiap sumuran, lalu dibiarkan selama 10 menit lalu pipet mixing untuk memastikan semua biofilm telah terlarutkan dengan mindahkan 125 μ l dari masing-masing sampel ke well plate flat bottom yang baru lalu memeriksa absorbansi menggunakan plate reader pada 550 nm.

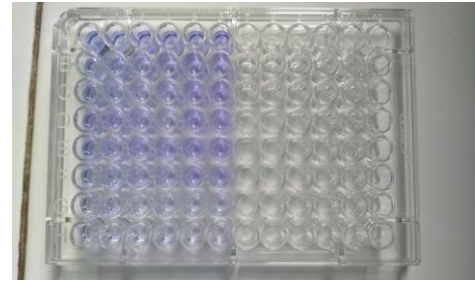
Analisa Data

Data yang diperoleh dikonversikan menggunakan software *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) lalu dilakukan uji parametrik dengan menggunakan uji statistik *One Way Analysis of Varians* (ANOVA). Kemudian dapat dilakukan uji lanjutan yaitu Post hoc analitic *Honesty Significance Different* (HSD). Apabila data yang diperoleh tidak normal atau tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney*. Data dinyatakan signifikan jika $p < 0.05$.

HASIL PENELITIAN

Produksi Biofilm oleh *Staphylococcus aureus* pada media BHI dan TSB

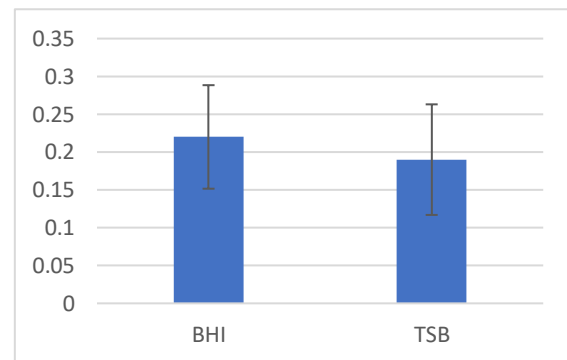
Produksi biofilm oleh *staphylococcus aureus* pada media BHI dan TSB dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Hasil produksi biofilm *staphylococcus aureus*

Keterangan: semakin ungu semakin terdapat biofilm

Tabel 2 Perbandingan biofilm BHI dan TSB oleh *Staphylococcus aureus*

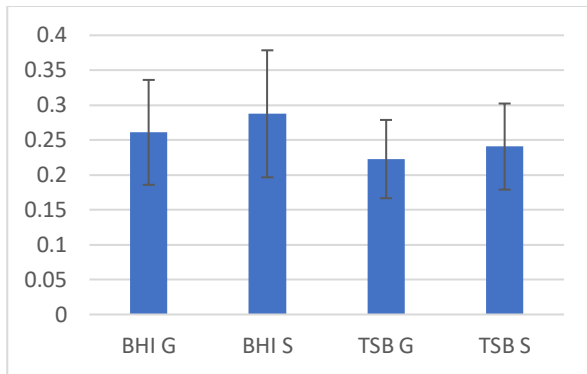


Gambar 2. Grafik perbandingan biofilm BHI dan TSB

Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok dengan bakteri *S. aureus* ($p < 0.05$). Tidak terdapat perbedaan signifikan antara produksi biofilm *S. aureus* pada BHI dan TSB ($p > 0.05$).

Membandingkan biofilm *S. Aureus* dengan pemberian glukosa dan sukrosa 5%

Tabel 3: Perbandingan Biofilm antara BHI Glukosa, BHI Sukrosa, dengan TSB Glukosa dan TSB Sukrosa



Gambar 3 Grafik perbandingan Biofilm antara BHI Glukosa, BHI Sukrosa, dengan TSB Glukosa dan TSB Sukrosa

Pada gambar 3 dan tabel 3 Tidak didapatkan signifikansi pengaruh jumlah biofilm pada semua media dengan penambahan glukosa maupun sukrosa ($p < 0.05$).

PEMBAHASAN

Produksi biofilm pada media BHI dan TSB

Pada penelitian ini, ditemukan bahwa media BHI dan TSB memiliki kemampuan yang sama dalam produksi biofilm oleh *S. aureus*. Jika kita cermati secara fungsional semua BHI dan TSB adalah media penyubur universal, yang bertujuan menumbuhkan semua jenis bakteri, dan memang terlihat dengan jelas bahwa isolat *S. aureus* mampu tumbuh ketika ditumbuhkan media tersebut dan kemampuannya membentuk biofilm terlihat sama antara satu media dengan media yang lain. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Chen *et al* yang menyebutkan bahwa biofilm *S. aureus* dapat terbentuk dengan baik pada media TSB atau BHI di bawah kondisi fluida dinamik maupun kondisi statis.⁹

Kedua media tersebut baik untuk menumbuhkan *S. aureus* dikarenakan BHI mengandung komponen protein terutama kaya leusin, prolin, serin, dan aspartat berlimpah dan asam amino ini penting untuk produksi adhesin sebagai protein pengikat fibronectin dan faktor penggumpalan yang diperlukan. Kehadiran lipid seperti kolin dan sphingosine pada BHI mungkin memiliki keuntungan tambahan dalam pembentukan biofilm dan memberikan ketahanan dari pengeringan. Selanjutnya, adalah sumber gula seperti inositol/myoinositol yang tidak dapat difermentasi oleh *S. aureus* yang menyebabkan resistensi penurunan pH dan mungkin diperlukan untuk arsitektur biofilm yang kuat.¹⁰ Sedangkan TSB mengandung dua pepton sebagai sumber nitrogen yang diperoleh dengan hidrolisis enzimatis soy protein dan kasein sehingga media ini mendukung pertumbuhan yang berbagai mikroorganisme. Soy pepton juga mengandung gula alami yang merangsang pertumbuhan bakteri.¹¹ Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus*

memiliki produksi biofilm yang tergolong lemah. Hal ini menjadikan perubahan produksi biofilm pada variasi media tidak dapat diamati dengan baik.

Produksi biofilm pada penambahan glukosa dan sukrosa

Pada penelitian, ditemukan bahwa dengan penambahan sukrosa dan glukosa pada media BHI dan TSB tidak mempengaruhi pertumbuhan biofilm *S. aureus*. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan glukosa dapat menginduksi sel bakteri untuk membentuk biofilm dengan regulasi operon *glaAB*, dan mutasi *glaB* menghasilkan penurunan pembentukan biofilm yang diinduksi glukosa. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Paleczny *et al* yang juga menyebutkan bahwa bahwa regulator gen aksesoris (*agr*), terkait dengan virulensi *S. aureus*, diatur oleh banyak faktor metabolik dan lingkungan. Sistem *agr* menyangkut pengatur pembentukan dan de-attachment biofilm. Terdapat dampak sistem *agr* pada penurunan kemampuan stafilokokus untuk membentuk biofilm pada permukaan polistiren.

KESIMPULAN

Dari hasil analisis data dan pembahasan penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Media TSB dengan BHI memiliki kemampuan yang sama dalam produksi biofilm untuk *S. aureus*
2. Pada Media BHI, penambahan glukosa maupun sukrosa tidak berpengaruh pada jumlah biofilm.
3. Pada media TSB, penambahan glukosa maupun sukrosa tidak berpengaruh pada jumlah biofilm.
4. Pada semua media, produksi biofilm tergolong lemah (weak).

SARAN

Saran untuk pengembangan dan perbaikan penelitian ini dimasa yang akan datang, antara lain:

1. Menggunakan bakteri yang memiliki kemampuan produksi biofilm moderate atau high.
2. Melakukan optimasi dengan media lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang telah mendanai penelitian Terima kasih juga diberikan kepada ibu Nofie Irmalia Nurita, SSi.

Terima kasih kepada analis laboratorium LPRK yang telah membantu dalam pengambilan data penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tong, Steven Y C et al. "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management." *Clinical microbiology reviews* vol. 28,3 (2015): 603-61. doi:10.1128/CMR.00134-14
2. Idrees, Muhammad et al. "Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies." *International journal of environmental research and public health* vol. 18,14 7602. 16 Jul. 2021, doi:10.3390/ijerph18147602
3. Archer, Nathan K et al. "Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease." *Virulence* vol. 2,5 (2011): 445-59. doi:10.4161/viru.2.5.17724
4. Weigel, Linda M., et al. "High-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with a polymicrobial biofilm." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51.1 (2007): 231-238.
5. Otto, M. "Staphylococcal biofilms." *Current topics in microbiology and immunology* vol. 322 (2008): 207-28. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_10
6. Kelly, D., et al. "Prevention of Staphylococcus aureus biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives." *Letters in applied microbiology* 54.4 (2012): 286-291.
7. Bhattacharya, Mohini et al. "Prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms." *Expert review of anti-infective therapy* vol. 13,12 (2015): 1499-516. doi:10.1586/14787210.2015.1100533
8. Coffey, Barbara M, and Gregory G Anderson. "Biofilm formation in the 96-well microtiter plate." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1149 (2014): 631-41. doi:10.1007/978-1-4939-0473-0_48
9. Chen, Ping et al. "An improved medium for growing Staphylococcus aureus biofilm." *Journal of microbiological methods* vol. 90,2 (2012): 115-8. doi:10.1016/j.mimet.2012.04.009
10. Singh, Ashish Kumar et al. "Standardization and Classification of *In vitro* Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*." *Journal of global infectious diseases* vol. 9,3 (2017): 93-101. doi:10.4103/jgid.jgid_91_16
11. Gibbons and McDonald. J. *Bacteriol.*, 80:164. 1960. Havens and Benham. A. *Med. Tech.*, 23:305. 1957.
12. You, Yibo et al. "Staphylococcus aureus glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner." *International journal of medical microbiology : IJMM* vol. 304,5-6 (2014): 603-12. doi:10.1016/j.ijmm.2014.04.003
13. Paleczny, Justyna et al. "The High Impact of *Staphylococcus aureus* Biofilm Culture Medium on *In Vitro* Outcomes of Antimicrobial Activity of Wound Antiseptics and Antibiotic." *Pathogens (Basel, Switzerland)* vol. 10,11 1385. 26 Oct. 2021, doi:10.3390/pathogens1011138

