

## Deteksi Biofilm *Staphylococcus aureus* dari Susu Mastitis Subklinis

### *Detection of Staphylococcus aureus Biofilm from Subclinical Mastitis Milk*

MuhamadArfan Lesmana<sup>1\*</sup>, Dahliatul Qosimah<sup>2</sup>, Sri Murwani<sup>2</sup>, Ahmad Choirul Nahrowi<sup>2</sup>, Sonya Loresta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

<sup>2</sup>Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

\*E-mail : arfan142002@yahoo.com

#### ABSTRAK

Salah satu factor virulensi *S.aureus* adalah pembentukan biofilm. Ketika biofilm terbentuk, bakteri akan mengalami perubahan fenotipik yang membutuhkan konsentrasi antibiotik yang lebih tinggi untuk menghambat proliferasi. Perubahan fenotipik akan menyebabkan peningkatan produksi matriks ekstraseluler dan koloni berlapis-lapis, menurunkan tingkat metabolisme, multiplikasi dan kolonisasi polimikroba yang mengakibatkan infeksi berulang pada inang dan kesulitan diobati dengan antibiotik karena resistensi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pembentukan biofilm bakteri dengan *slime* dan kuantitatif dengan metode titer mikroplate. Metode penelitian adalah deskriptif kualitatif dengan menggunakan 27 sampel *Staphylococcus aureus* dengan karakteristik mastitis susu. Berdasarkan penelitian sebelumnya, menunjukkan bakteri resisten terhadap berbagai antibiotika. Bakteri ditumbuhkan pada media CRA (*Congo Red Agar*) untuk melihat biofilm lender melalui koloni bakteri hitam diikuti dengan metode Plat Mikrotiter dengan panjang gelombang 570 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 27 sampel *Staphylococcus aureus* yang positif membentuk *slime* biofilm sebanyak 10 sampel dilanjutkan dengan lempeng mikrotiter menunjukkan 3 sampel biofilm positif. Kesimpulan dari studi ini adalah *Staphylococcus aureus* dalam sampel susu mastitis subklinis positif membentuk biofilm.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, biofilm, mastitis, plate mikrotiter

#### ABSTRACT

One of *S.aureus's* virulence factors is biofilm formation. When biofilms are formed, the bacteria will undergo phenotypic changes that require higher concentrations of antibiotics to inhibit proliferation. Phenotypic changes will lead to increase the production of extracellular matrix and multilayered colonies as well as decrease of metabolic rates, multiplication and polymicrobial colonization resulting in recurrent infection in the host and difficulty being treated with antibiotics due to resistance. The aim of this research was to know the formation of bacterial biofilm by *slime* and quantitative by microplate titer method. The research method was qualitative descriptive using 27 samples of *Staphylococcus aureus* with characterized from mastitis infected milk. The bacteria were grown on CRA (*Congo Red Agar*) media to observe the *slime* biofilm through bacteria black colony followed by MicrotiterPlate method with 570nm wave length. The results showed that 27 samples of *Staphylococcus aureus* which positive to form *slime* biofilm were 10 samples and continued to microtiter plate showed 3 positive samples of biofilm. The conclusions of this study, *Staphylococcus aureus* in subclinical mastitis milk samples were positive to form biofilms.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biofilm, mastitis, microtiter plate

## PENDAHULUAN

Mastitis merupakan penyakit yang dapat menginfeksi sapi perah dan menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar pada industri susu (Fabres-Klein, *et al.*, 2015). Pada ternak yang menderita mastitis dengan munculnya inflamasi dapat menyebabkan rasa nyeri dan tidak nyaman. Pada beberapa kasus menyebabkan poisoning dan *premature death* (Kudi, *et al.*, 2009). Sekitar 65% menunjukkan bahwa infeksi mastitis yang disebabkan *S. aureus* berhubungan dengan pembentukan biofilm (Barraud *et al.*, 2009).

Biofilm merupakan faktor virulensi dari *Staphylococcus*, yang berfungsi memfasilitasi persistensi dalam tubuh hospes, menghindari sistem pertahanan hospes sehingga menyebabkan bakteri tahan pada antimikroba dengan konsentrasi tinggi. Bakteri biofilm memiliki kemampuan 100-1000 kali relatif lebih resisten dibandingkan sel plankton bakteri (Qu, *et al.*, 2010). Biofilm relatif tahan terhadap kekeringan. Resistensi ini akan berimplikasi pada klinis maupun mikrobiologi industri.

Biofilm muncul pada lingkungan alami dan dalam jaringan yang terinfeksi. Biofilm dapat dijumpai pada beberapa penyakit hewan seperti: mastitis (disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), Abses hati, Lymphadenitis, enteritis dan infeksi luka. Pembentukan biofilm diatur oleh *polysaccharide intracellular adhesin* (PIA), merupakan produk gen *icaADBC* yang memperantarai kemampuan sel bakteri untuk adhesi (Mathur *et al.*, 2006). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pembentukan biofilm bakteri dengan *slime* dan kuantitatif dengan metode titer mikroplate.

## MATERI DAN METODE

### Isolasi Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang sudah terkarakterisasi melalui pewarnaan Gram, morfologi dan uji biokimia yang berasal dari susu sapi penderita mastitis subklinis sebanyak 27 isolat (Cowan and Steel's, 2003). Pengujian susu mastitis subklinis berdasarkan pengamatan fisik ambung yaitu bengkak dan terjadi penurunan produksi susu serta pengamatan karakteristik susu yaitu menggumpal dilanjutkan dengan uji CMT (*California Mastitis Test*) dan uji Breed (*Somatic Cell Count*) (Pradieé, 2012). Bakteri *Staphylococcus aureus* dari susu mastitis yang digunakan berdasar penelitian sebelumnya resisten terhadap penicillin G, Amoxicillin dan Methicillin (Qosimah and Supriyanto, 2016).

### Uji Pembentukan *Slime* Biofilm Metode *Modified Congo Red Agar*

Metode ini digunakan untuk mengetahui pembentukan biofilm awal dengan produksi *slime* menurut Barraud *et al.* (2009) dan Mariana *et al.* (2009) menggunakan *Modified Congo Red Agar* dengan komposisi *Congo red stain* 0.4 gr, glukosa 10 gr, *Blood Agar Base* 40 gr dan Akuades 1000 ml kemudian disterilkan.

Sampel bakteri *S.aureus* kemudian ditanam pada media tersebut dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Hasil positif diamati dengan terbentuknya pigmen koloni hitam dengan konsistensi *dry crystalline* menunjukkan terbentuknya strain bakteri yang memproduksi *slime*. Sedangkan koloni hitam pada *center* tanpa *dry crystalline* atau koloni berwarna merah merupakan biofilm negatif yang berarti strain bakteri tidak memproduksi *slime* (Atshan, *et al.*, 2012).

### Uji Biofilm dengan Metode Mikrotiter Plate

Satu koloni bakteri *S.aureus* diinokulasikan pada 5 ml media TSB (*Trypticase Soy Broth*) dicampur 2,5% glukosa dan diinkubasi pada incubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya suspensi bakteri tersebut disetarakan dengan metode Mc Farland 0,5 dengan perkiraan jumlah bakteri  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml dan diencerkan hingga  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml. 100 µl suspensi bakteri diisikan pada mikroplate 96 lubang-flat (Nunc Delta; NUNC, Roskilde, Denmark) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Suspensi bakteri dicuci dengan PBS dengan pH 7,5 sebanyak 3x. Biofilm difiksasi dengan menambahkan methanol sebanyak 200µL ke dalam well selama 15 menit, selanjutnya methanol dibuang. Setiap sumuran diisi dengan 2% kristal violet sebanyak 200µL selama 5 menit kemudian sisa pewarnaan dicuci dengan PBS. Sebanyak 200µL asam asetat glasial 33% dimasukkan kedalam setiap well selama 15 menit. Dilakukan secara triplo. Setiap prosedur dilakukan satu sampel pada 4 lubang dan dilakukan pada 2 plate.

Dibaca dengan ELISA Reader pada panjang gelombang 570 nm. Sel bakteri yang melekat pada dinding dianggap sebagai biofilm. Penentuan terbentuknya biofilm berdasarkan skala OD positif ( $A_{570} > 0,8$ ), dan negatif ( $A_{570} \leq 0,8$ ).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pembentukan *Slime* Biofilm

Berdasarkan hasil penelitian bahwa 27 sampel *Staphylococcus aureus* yang sudah diidentifikasi oleh Supriyanto (2014) menunjukkan positif terhadap *slime* biofilm adalah 10 sampel dengan menggunakan media CRA (*Congo Red Agar*) (Tabel 1.). Bakteri yang

membentuk *Slime* menunjukkan koloni berwarna hitam (Gambar 1) berfungsi sebagai matriks protektif yang berada disekeliling sel bakteri yang berperan sebagai pembentukan struktur biofilm, utamanya dibentuk oleh *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA) (Fabres-Klein, et al., 2015). Metode identifikasi pembentukan biofilm menggunakan media CRA memiliki keuntungan mudah dilakukan, diulang, dan koloni bakteri dapat terlihat jelas tumbuh di koloni (Kaiser et al., 2013). Metode CRA memiliki kelemahan karena kurang sensitif untuk menentukan strain yang membentuk lapisan ekstraseluler lebih tipis pada *slime* negatif biofilm. Warna hitam yang terbentuk akibat hubungan antara tebal lapisan dan eksopolisakarida dengan pewarnaan *Congo Red*, sehingga akan menurun pada strain yang negatif *slime* yang menyebabkan warna merah. Ketebalan dari lapisan polisakarida disekitar dinding sel bakteri berbeda diantara strain *S.aureus* (Fabres-Klein, et al., 2015).

Perlekatan mikroorganisme pada proses pengaturan gen untuk membentuk biofilm diperantarai oleh medium, substrat dan permukaan sel. Struktur biofilm yang terbentuk terdiri dari sel mikroba yang menempel pada permukaan material yang diselubungi dengan matriks *extracellular polymeric substance* (EPS) sehingga memberikan lingkungan optimal untuk pertukaran materi genetik antar sel (Donlan, 2002). Kemampuan bakteri *Staphylococcus* untuk melekat pada permukaan biomaterial merupakan salah satu faktor virulensi bakteri (Stepanovic, et al., 2007).

*Staphylococcus* yang ditumbuhkan pada Media Agar berbeda dengan media cair berdasarkan ekspresi dari molekul sel (Stepanovic, et al., 2007). *Staphylococcus* memiliki kapsul atau *slime* layer yang dikenal sebagai *soft polyelectrolyte layers* disekeliling bakteri. *Layer* berfungsi

menurunkan barrier energi yang disebabkan oleh tolakan elektrostatik pada interaksi antara bakteri dan substrat bermuatan negatif sehingga berperan penting pada perlekatan bakteri. Pertumbuhan biofilm lebih cepat pada media Agar dibandingkan media cair. Hal ini disebabkan kondisi tersebut menyerupai situasi *in vivo* dan bakteri

akan meningkat perlekatannya untuk membentuk biofilm pada permukaan yang lebih kasar dan bersifat hidrofobik sehingga meningkatkan kondisi non polar pada permukaan (Donlan, 2002; Stepanovic', *et al.*, 2007). Bakteri dalam biofilm akan resisten terhadap antibiotika, desinfektan dan sistem imun hospes.

**Tabel 1.** Hasil sampel *Staphylococcus aureus* yang menunjukkan positif *slime* biofilm

NO	KODE SAMPEL	WARNA KOLONI	CRA
1.	S1	Hitam	Positif
2.	S2	Merah	Negatif
3.	S3	Hitam	Positif
4.	S4	Merah	Negatif
5.	S5	Hitam	Positif
6.	S6	Merah	Negatif
7.	S7	Hitam	Positif
8.	S8	Merah	Negatif
9.	S9	Hitam	Positif
10.	S10	Hitam	Positif
11.	S11	Hitam	Positif
12.	S12	Merah	Negatif
13.	S13	Merah	Negatif
14.	S14	Merah	Negatif
15.	S15	Hitam	Positif
16.	S16	Merah	Negatif
17.	S17	Merah	Negatif
18.	S18	Hitam	Positif
19.	S19	Merah	Negatif
20.	S20	Merah	Negatif
21.	S21	Merah	Negatif
22.	S22	Merah	Negatif
23.	S23	Merah	Negatif
24.	S24	Merah	Negatif
25.	S25	Merah	Negatif
26.	S26	Merah	Negatif
27.	S27	Merah	Negatif



**Gambar 1.** *Staphylococcus aureus* membentuk *slime*. Positif *Slime* Biofilm, koloni berwarna hitam

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini resisten terhadap beberapa antibiotika. Biofilm bertindak mencegah penetrasi antimikroba ke dalam sel bakteri dan matrik biofilm akan merangsang bakteri sampai pada pengenceran sulit dihambat antibiotika. Keberadaan fisiologi bakteri dapat mempengaruhi sensitifitas terhadap antibiotik (Marques, *et al.*, 2017).

### Hasil Optical Density Biofilm *Staphylococcus aureus* Menggunakan *Microtiter Plate*

Metode kuantitatif dari Biofilm berdasarkan kultivikasi biofilm pada dinding *Microtiter Plate* selanjutnya dideteksi menggunakan pewarnaan dan diukur menggunakan spektrofotometer. Metode pengujian *Microtiter Plate* masih sering digunakan untuk mendeteksi biofilm (Stepanovic', *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa 6 sampel positif membentuk biofilm dari 10 sampel yang positif

membentuk *slime* (Tabel 2). Jumlah bakteri yang banyak pada fase Log akan mempengaruhi pembentukan biofilm yang berhubungan dengan gen berdasarkan *quorum sensing* (Kaiser *et al.*, 2013). Kepadatan biofilm berkorelasi positif dengan banyaknya inokulum. Pada penelitian menggunakan konsentrasi bakteri sebanyak  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml.

Media pertumbuhan yang digunakan adalah TSB yang mampu merangsang pembentukan biofilm (Fabres-Klein, *et al.*, 2015). Uji *Microtiter Plate* bersifat statis, kondisi pertumbuhan bakteri berkelompok dan tidak memungkinkan pembentukan biofilm matur yang terkait dengan sistem sel aliran. Uji ini efektif untuk mengidentifikasi banyak faktor yang diperlukan untuk inisiasi pembentukan biofilm (flagella, pili, adhesins, enzim yang terlibat dalam siklus GMP dan metabolisme) dan juga gen yang terlibat dalam produksi polisakarida ekstraselular (O'Toole, 2011).

Tabel 2. Hasil OD Bakteri pembentuk Biofilm

KODE SAMPEL	RERATA $\pm$ SD
S1	0,25 $\pm$ 0,04
S3	0,28 $\pm$ 0,05
S5	3,33 $\pm$ 0,07
S7	3,22 $\pm$ 0,13
S9	3,23 $\pm$ 0,22
S10	0,34 $\pm$ 0,04
S11	0,86 $\pm$ 0,05
S15	0,32 $\pm$ 0,05
S18	0,80 $\pm$ 0,10
S23	1,96 $\pm$ 1,01

## KESIMPULAN

Dua puluh tujuh isolat bakteri *Staphylococcus* yang menunjukkan terbentuknya *slime* biofilm sebanyak 10 isolat. Sepuluh isolat sampel bakteri yang positif membentuk biofilm sebanyak 6 isolat berdasarkan uji *Microtiter Plate*.

## DAFTAR PUSTAKA

Atshan, S.S., Mariana Nor Shamsudin, Zamberi Sekawi, Leslie Than Thian Lung, Rukman Awang Hamat, Arunkumar Karunanidhi, Alreshidi Mateg Ali Ehsanollah Ghaznavi-Rad, Hamed Ghasemzadeh-Moghaddam. 2012. Research Article. Prevalence of Adhesion and Regulation of Biofilm-Related Genes in Different

- Clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2012.
- Barraud, N., Michael V. Storey Zoe P. Moore Jeremy S. Webb Scott A. Rice Staffan Kjelleberg. 2009. Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. Microbial Biotechnology (2009) 2 (3), 370–378
- Cowan and Steel's. 2003. Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press. P :52-58
- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Perspektif. Emerging Infectious Diseases • Vol. 8, No. 9, September 2002
- Fabres-Klein, M.H., Santos, M.J.C., Klein, R.C., de Souza, G.N and Andrea de sa, B.R. 2015. An association between milk and *slime* increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. BMC Vet Res. 2015; 11: 3.
- Kaiser, T.D.L., Pereira, E.M., dos Santos, K.R.N., Maciel, E.L.N., Schuenck, R.P and Nunes, A.P.F. 2013. Modification of the *Congo Red* agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. Diagnostic of Microbiology and Infectious Disease 75, 235-239.
- Kudi, A.C., M.P. Bray & Aziwo.T.Niba 2009. Mastitis Causing Pathogens within the Dairy Cattle Environment. International Journal of Biology, Vol 1, No 1.
- Mariana, N.S., S. A. Salman<sup>1</sup>, V. Neela and S. Zamberi (2009) Evaluation of Modified *Congo Red* Agar for Detection of Biofilm Produced by Clinical Isolates of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*. African Journal of Microbiology Research, 3, 330-338.
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol. 2006 Jan;24(1):25-9.
- Marques, V.F., Da Matto, C.C., Soares, B.S., De Mola, D.A. 2017. Biofilm Production and Beta Lactamic Resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolate from Bovine Mastitis. Brazilian Journal of Microbiologi 48, 118-124.
- O'Toole, G.A. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. Journal of Visualized Experiments 47.
- Pradieé, J., Cristiane da Rosa Moraes, Michele Gonçalves, Marcele Sousa Vilanova, Gladis Ferreira Corrê, Otoniel Geter Lauz, Maria Teresa Moreira Osório and Verônica Schmid. 2012. Somatic Cell Count and California Mastitis Test as a Diagnostic Tool for Subclinical Mastitis in Ewes. Acta Scientiae Veterinariae, 2012. 40(2): 1038.
- Qu, Y., Andrew Daley, Taghrid S Istivan., Suzanne M Garland and Margaret A Deighton. 2010. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2010, 9:16
- Supriyanto. 2014. Prevalensi, Faktor Risiko Dan Analisis Kerugian Nilai Ekonomi Mastitis Oleh *Staphylococcus Aureus* Pada Susu Di Eks-Karesidenan Madiun. Fakultas

- Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. (Thesis).  
Stepanovic´, S., Vukovic´, D., Veronika, H., Giovanni, D.B., Slobodanka, D´., Ivana, C´. I´ And Filip, R. 2002. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. APMIS 115: 891–9, 2007.  
Qosimah, D and Supriyanto. 2016. The Resistance Patterns of Bacteria *Staphylococcus aureus* against Various Antibiotics. International Journal of PharmTech Research Vol.9, No.8, pp 326-331, 2016.