

Optimasi Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Melalui Penambahan Glukosa dan NaCl

MASRUKHIN^{1*}, RUBY SETIAWAN¹, MIA KUSMIATI¹, SUGIYONO SAPUTRA¹

¹Research Center for Biology, National Research and Innovation Agency
Jl. Raya Bogor KM. 46 Bogor, Indonesia. 16911

*Email: masrukhin21@gmail.com

ABSTRACT

Biofilm is the aggregate form and organized of microbial cells in the certain environment. Generally, biofilm used as the defense mechanism of the microbes in the non-favorable environment and increase the nutrient uptake. Moreover, the biofilm also contributes in the enhancement of antimicrobial resistance. In this research the in-vitro biofilm formation assay with the glucose and NaCl supplementation was carried out. So that, the optimum condition and nutrient composition can be well optimized. Therefore, the aim of this preliminary study is to determine the optimum condition of biofilm formation by using glucose and NaCl supplementation In *S. aureus* InaCC B4 and *P. aeruginosa* InaCC B3. In the future, the optimum condition in this study can be used as the reference condition for biofilm characterization and anti-biofilm assay of certain compounds. The biofilm formation assay was conducted on a 96-well microtiter plate, using trypticase soy agar (TSB) which supplemented with glucose and NaCl with the concentration range of 0-2% for glucose and 0-4% for NaCl. The assay was carried out with three replicates in one microtiter plate. The assay was measured through absorbance at wavelength 595 nm using a multimode microplate reader. According to the results, the addition of 1% glucose gave the best results for the formation of *S. aureus* InaCC B4 biofilm and significantly different with other concentrations. As for *P. aeruginosa* InaCC B3, glucose supplementation of 0.125, 0.5 and 1% did not have a significant effect on biofilm formation, when compared to the control (0% supplementation). In addition, generally NaCl supplementation had no significant effect on the formation of *S. aureus* biofilms. Meanwhile in *P. aeruginosa*, supplementation with NaCl concentrations of 0.125, 0.25 and 1% could increase biofilm formation, therefore, further confirmation is needed.

Keywords: antimicrobial resistance; biofilm formation; glucose; NaCl; pathogen

INTISARI

Biofilm merupakan bentuk agregasi sel mikroorganisme yang terbentuk dan terorganisir guna membuat lingkungan mikro dari mikroorganisme tersebut. Biofilm pada umumnya juga digunakan sebagai mekanisme bertahan pada suatu kondisi lingkungan, sehingga pada biofilm tersebut mikroorganisme dapat memerangkap nutrisi memanfaatkannya. Selain itu biofilm berkontribusi pada peningkatan resistensi terhadap antimikroba. Pada penelitian ini dilakukan pengujian pembentukan biofilm secara in-vitro dengan suplementasi glukosa dan NaCl sehingga dapat diketahui kondisi optimum dalam pembentukan biofilm tersebut. Tujuan dari penelitian ini yakni untuk mengetahui kondisi optimum pembentukan biofilm pada bakteri *S. aureus* InaCC B4 dan *P. aeruginosa* InaCC B3, sehingga kedepannya dapat digunakan sebagai kondisi acuan dalam pengujian karakteristik biofilm maupun senyawa anti-biofilm. Uji pembentukan biofilm dilakukan pada 96-well microtiter plate, dengan menggunakan media trypticase soy agar (TSB) yang disuplementasi glukosa dan NaCl dengan rentang konsentrasi 0-2% untuk glukosa dan 0-4% untuk NaCl. Pengujian dilakukan dengan tiga ulangan dalam satu plate. Hasil pengujian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm menggunakan multimode microplate reader. Hasil pengujian menunjukkan penambahan 1% glukosa memberikan hasil terbaik untuk pembentukan biofilm *S. aureus* InaCC B4. Adapun pada *P. aeruginosa* InaCC B3, suplementasi glukosa 0,125, 0,5 dan 1 % tidak memberikan pengaruh nyata pada pembentukan biofilm, jika dibandingkan dengan kontrol (suplementasi 0%). Selain itu, secara umum suplementasi NaCl tidak memberikan pengaruh nyata pada pembentukan biofilm *S. aureus*, sedangkan ada *P. aeruginosa* suplementasi NaCl dengan konsentrasi 0,125, 0,25 dan 1 % dapat meningkatkan pembentukan biofilm, sehingga perlu dilakukan konfirmasi lebih lanjut.

Kata kunci: glukosa; NaCl; patogen; pembentukan biofilm; resistensi antimikroba

PENDAHULUAN

Biofilm merupakan bentuk kompleks agregat sel mikroorganisme yang terbentuk dan terorganisir guna membuat lingkungan mikro dari mikroorganisme tersebut. Secara umum biofilm tersusun atas matriks *extracellular polymeric substances* (EPS), protein, dan atau DNA ekstraseluler (eDNA) (Stewart, 2002; Tam *et al.*, 2020). Biofilm pada umumnya juga digunakan sebagai strategi bertahan pada suatu kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan seperti fluktuasi suhu maupun nutrisi (Rollet *et al.*, 2008). Selain itu bakteri yang mampu menghasilkan biofilm, dapat lolos dari system imun inang dan berpotensi lebih resisten terhadap antibiotik. Pada bakteri patogen seperti *S. aureus* biofilm berasosiasi dengan karakter resistensi antibiotik, misalnya, *Methicillin Resistant S. aureus* (MRSA) menghasilkan biofilm lebih tinggi dibandingkan dengan *Methicillin Susceptible S. aureus* (MSSA) (Mccarthy *et al.*, 2015; Lade *et al.*, 2019).

Secara umum terdapat beberapa faktor lingkungan yang memengaruhi produksi biofilm pada bakteri yaitu faktor suhu, osmolaritas, konsentrasi *ferrous iron ion*, ketersediaan nutrisi, permukaan material penempelan biofilm, dan keasaman lingkungannya (Toyofuku *et al.*, 2016; Ponomareva *et al.*, 2018). Selain faktor lingkungan faktor genotype dari bakteri juga diduga memiliki peranan penting dalam pembentukan biofilm (Lade *et al.*, 2019). Faktor nutrisi menjadi faktor signifikan dalam membentuk biofilm pada bakteri. Faktor ini menjadi hal yang paling mudah dimodifikasi secara *in vitro* dalam peningkatan pembentukan biofilm. Suplementasi beberapa jenis sumber karbon dilaporkan dapat meningkatkan produksi biofilm pada media nutrient agar. Sumber karbon tersebut yakni glukosa, sukrosa, maltosa dan laktosa (Zou & Liu, 2020). Selain sumber karbon, NaCl juga berpengaruh dalam pembentukan biofilm melalui perubahan osmolaritas. Konsentrasi optimum NaCl untuk tiap bakteri pun berbeda, misalnya *Staphylococcus epidermidis* memiliki konsentrasi optimum NaCl 0,5 mol/L, *S. aureus*

0,3 mol/L, *Escherichia coli* 0,002 mol/L dan *Hemophilus influenza* 0,02 mol/L (Ponomareva *et al.*, 2018).

Pengujian karakteristik biofilm maupun senyawa anti-biofilm membutuhkan kondisi optimum yang *robust* untuk memberikan hasil yang akurat. Berbagai penelitian telah melaporkan bahwa sumber karbon memiliki peranan penting dalam pembentukan biofilm, selain itu strain bakteri juga memiliki peranan penting dalam pembentukan biofilm tersebut. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum dari suplementasi glukosa dan NaCl dalam meningkatkan pembentukan biofilm pada *S. aureus* InaCC B4 dan *P. aeruginosa* InaCC B3, sehingga dapat digunakan sebagai kondisi optimum pengujian terkait biofilm menggunakan strain bakteri tersebut.

METODE PENELITIAN

Koleksi Isolat Bakteri

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biosistemika dan Evolusi Mikroorganisme, Pusat Riset Biologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Isolat *S. aureus* InaCC B4 dan *P. aeruginosa* InaCC B3 diperoleh dari koleksi bakteri *Indonesia Culture Collection* (InaCC). Kedua isolat bakteri ditumbuhkan pada media *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji Resistensi Antibiotik

Uji resistensi antibiotik dilakukan dengan metode *disk diffusion assay* mengacu pada *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Isolat bakteri ditumbuhkan selama 24 jam pada media *Luria Bertani* (LB Broth), distandarkan dengan *McFarland turbidity standard* 0.5 (setara 1.5×10^8 CFU/mL). pengujian dilakukan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan dua jenis antibiotik yaitu Oxacillin (OX; 5 µg) dan Amoxicillin-clavulanat (AMC; 30 µg). Interpretasi hasil pengujian mengacu pada tabel *minimum inhibitory concentration* (MIC) dan diameter zona hambat (EUCAST, 2020).

Uji Pembentukan Biofilm

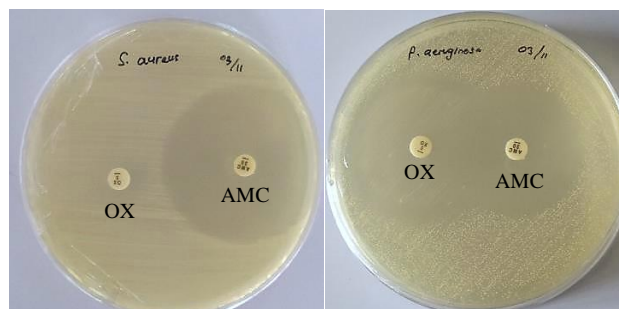
Pada studi ini dilakukan suplementasi glukosa dengan rentang konsentrasi 0-2% dan

NaCl 0-4%. Persentase suplementasi glukosa dan NaCl didasarkan pada konsentrasi glukosa dan NaCl yang menjadi komposisi media TSB, yaitu 2,5 g/L (0,25%) dan 5 g/L (0,5%). Sehingga total glukosa dalam media TSB tersebut adalah 0,25- 2,25% dan 0,5- 4,5% untuk NaCl. Adapun pengujian biofilm mengacu pada Christensen *et al.* (1985) dan Lade *et al.* (2019), menggunakan media *trypticase soy agar* (TSB) yang disuplementasi dengan glukosa dan NaCl. Isolat *S. aureus* dan *P. aeruginosa* ditumbuhkan pada media cair LB dan diinkubasi pada suhu ruang menggunakan inkubator *shaker* selama 24 jam. Konsentrasi kedua isolat distandarkan berdasarkan larutan *McFarland* 0,5. Sebanyak 2 μ L isolat bakteri diinokulasikan pada 200 μ L media TSB (dengan suplementasi glukosa dan NaCl) dalam 96-well *microtiter plate* dan diinkubasi dalam kondisi stasioner selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri dibuang dan dicuci dua kali dengan 200 μ L NaCl 0,85% kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit. Tiap sumur pada *microtiter plate* yang sudah dikeringkan kemudian ditamabahkan 150 μ L kristal violet 0,1% dan diinkubasi selama 30 menit. Pewarna kemudian dibuang dan dibilas dengan NaCl 0,85% sebanyak kali dan dikeringkan pada suhu ruang selama 30 menit. Sisa pewarna yang sudah kering masih melekat pada *microtiter plate* kemudian dilarutkan dengan 150 μ L asam asetat glasial 33% dan

diukur absorbansinya pada panjang gelombang OD595 nm menggunakan *multimode microplate reader* (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific- USA). Uji biofilm dilakukan dengan tiga ulangan dalam satu *microtiter plate*. Hasil pengukuran dianalisis statistik menggunakan *one way ANOVA* dengan uji lanjutan dilakukan dengan *Dunnnett's multiple comparison test* guna membandingkan perlakuan suplementasi glukosa maupun NaCl dengan kontrolnya (konsentrasi 0 %, tanpa suplementasi).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada studi ini dilakukan pengujian suplementasi glukosa maupun NaCl, guna melihat pengaruhnya terhadap pembentukan biofilm. Hal tersebut dilakukan guna mengetahui kondisi optimum pembentukan biofilm pada beberapa isolat bakteri, sehingga dapat digunakan sebagai pengujian maupun penelitian selanjutnya mengenai pengujian senyawa anti-biofilm. Adapun bakteri yang digunakan adalah *S. aureus* InaCC B4 dan *P. aeruginosa* InaCC B3. Pada studi ini dilakukan pengujian resistensi antibiotik (Gambar 1, Tabel 1) guna mengetahui tingkat resistensinya, khususnya pada *S. aureus*, sehingga dapat dikategorikan dalam *methicillin-resistant staphylococcus aureus* (MRSA) maupun *methicillin-susceptible staphylococcus aureus* (MSSA).



Gambar 1. Uji resistensi antibiotik isolat bakteri *S. aureus* InaCC B4 dan *P. aeruginosa* InaCC B3 (OX: Oxacilin, AMC: Amoxicillin clavulanic acid)

Berdasarkan profil resistensi antibiotik (Tabel 1) diketahui *S. aureus* InaCC B4 memiliki sifat resisten terhadap antibiotik oxacilin (OX) dan rentan terhadap antibiotik amoxicilin clavulanic acid (AMC). Adapun *P.*

aeruginosa InaCC B3 memiliki karakteristik rentan terhadap kedua antibiotik tersebut. Kedua antibiotik yang digunakan merupakan antibiotik golongan penicillin yang merupakan antibiotik β -lactam. Sehingga dapat diketahui *S.*

aureus yang digunakan diduga merupakan strain MSSA. Karakteristik resistensi antibiotik yang rendah pada kedua bakteri uji (Tabel 1) diduga berpengaruh pada pembentukan biofilm

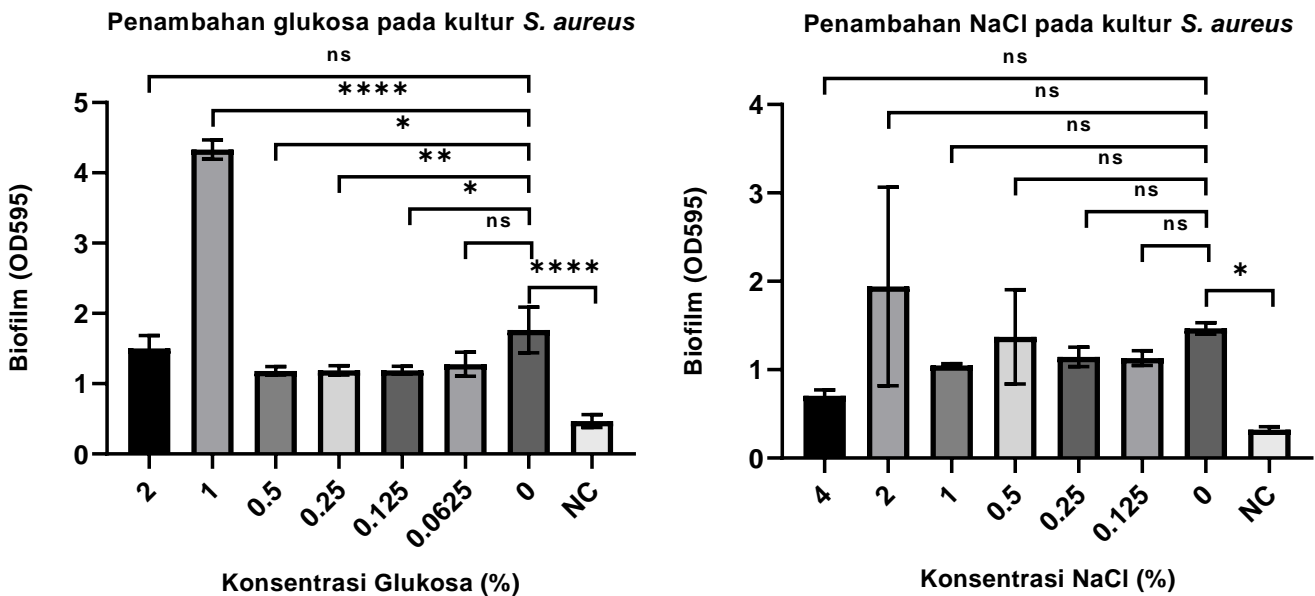
yang dihasilkan pada pengujian. Hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut tentang profil resistensi antibiotik yang lebih lengkap.

Tabel 1. Profil resistensi antibiotik dari 2 isolat yang digunakan terhadap antibiotik methycillin

Bacteria	Clear zone diameters (mm)			
	OX	R/I/S	AMC	R/I/S
<i>S. aureus</i> InaCC B4	-	R	48.3	S
<i>P. aeruginosa</i> InaCC B3	44.9	S	40.1	S

Perlakuan suplementasi glukosa pada *S. aureus* InaCC B4 memberikan hasil peningkatan yang signifikan, karena dapat meningkatkan pembentukan biofilm sebanyak 145% (n=3) jika dibandingkan dengan kontrol (suplementasi glukosa 0%). Adapun suplementasi NaCl pada *S. aureus* secara umum memberikan hasil yang tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol (Gambar 2).

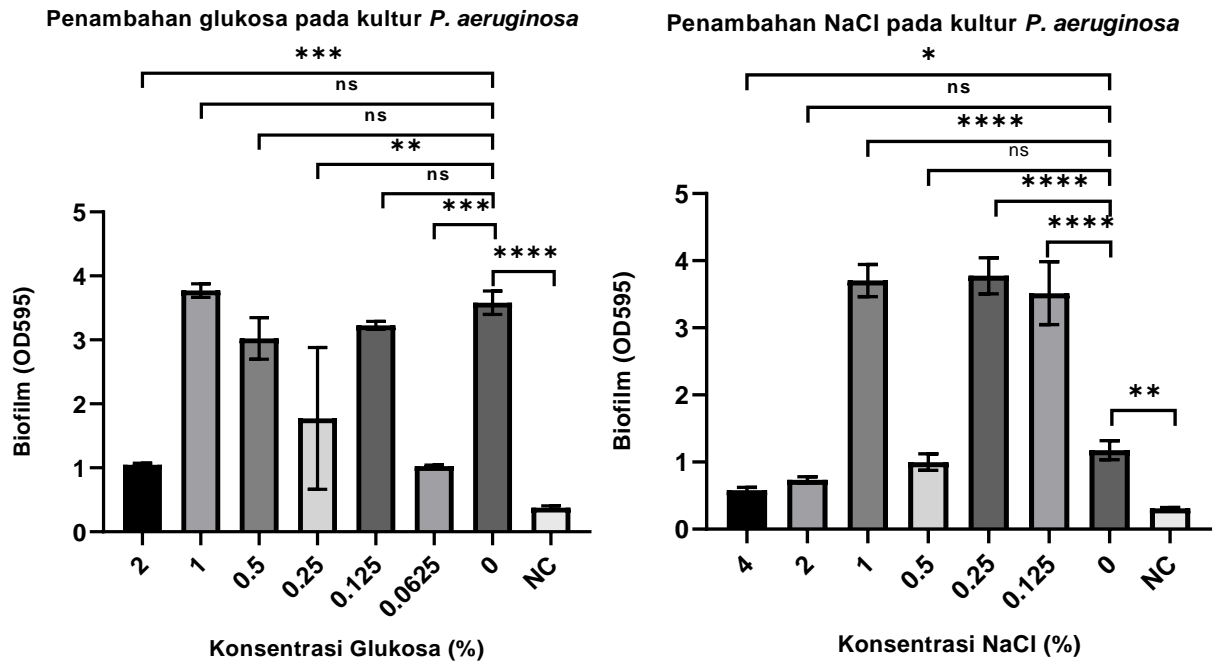
Adapun pada *P. aeruginosa* InaCC B3 perlakuan suplementasi glukosadan NaCl secara umum tidak memberikan hasil yang konsisten. Hal tersebut terlihat dari pengukuran biofilm pada kontrol (suplementasi 0%) yang tidak konsisten (Gambar 3), sehingga tidak dapat disimpulkan dan perlu studi lebih lanjut terkait kemampuan strain *susceptible* yang digunakan dalam menghasilkan biofilm.



Gambar 2. Pengaruh penambahan glukosa dan NaCl dengan variasi konsentrasi terhadap pembentukan bofilm pada *S. aureus* InaCC B4

Penelitian Lade *et al.*, (2019) menyebutkan penambahan glukosa 1% pada media TSB dapat meningkatkan produksi biofilm isolat klinis *S. aureus* secara signifikan baik pada MRSA maupun MSSA. Selain media TSB, media *brain heart infusion* (BHI) yang mengandung 2 g/L glukosa juga dilaporkan

dapat meningkatkan produksi biofilm, suplementasi 1% glukosa pada media BHI juga dilaporkan dapat meningkatkan produksi biofilm secara signifikan baik pada MRSA maupun MSSA (Oyama *et al.*, 2017; Sugimoto *et al.*, 2018).



Gambar 3. Pengaruh penambahan glukosa dan NaCl dengan variasi konsentrasi terhadap pembentukan bofilm pada *P. aeruginosa* InaCC B3

Adapun pada *Pseudomonas aeruginosa*, penelitian sebelumnya melaporkan, suplementasi 1-4% glukosa pada media LB dapat meningkatkan produksi biofilm. Peningkatan produksi biofilm melalui suplementasi glukosa terjadi karena adanya peningkatan ekspresi gen terkait regulasi polisakarida ekstraseluler (*extracellular polysaccharide-related gene*) *pslA*. Selain suplementasi glukosa, terdapat efek sinergis antara glukosa dan serum darah kuda (*horse serum*) dalam meningkatkan pembentukan biofilm (She *et al.*, 2019).

KESIMPULAN

Berdasarkan percobaan yang dilakukan, suplementasi glukosa 1% dapat meningkatkan secara signifikan produksi biofilm pada *S. aureus*, sehingga dapat digunakan sebagai kondisi optimum produksi biofilm. Adapun suplementasi NaCl secara umum memberikan hasil yang tidak berbeda nyata. Sedangkan

suplementasi glukosa dan NaCl pada *P. aeruginosa* memberikan hasil yang inkonsisten dan karakteristik strain bakteri tersebut masih perlu digali lebih lanjut terkait kemampuannya dalam memproduksi biofilm.

DAFTAR PUSTAKA

- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Larry, M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates : a Quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 22(6): 996–1006.
- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J.-M., Joo, H.-S., & Kim, J.-S. 2019. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *Journal of Clinical Medicine*. vol. 8(11): 1-14. <https://doi.org/10.3390/jcm8111853>
- Mccarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., Neill, E. O., & Gara, O. 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and*

- Infection Microbiology*: 5(1), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00001>.
- Oyama, L. B., Girdwood, S. E., Cookson, A. R., Fernandez-fuentes, N., Privé, F., Vallin, H. E., Wilkinson, T. J., Golyshin, P. N., Golyshina, O. V., Mikut, R., Hilpert, K., Richards, J., Wootton, M., Edwards, J. E., Maresca, M., Perrier, J., Lundy, F. T., Luo, Y., Zhou, M., ... Huws, S. A. 2017. The rumen microbiome: an underexplored resource for novel antimicrobial discovery. *Npj Biofilms and Microbiomes*. vol. October: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0042-1>.
- Ponomareva, A. L., Buzoleva, L. S., & Bogatyrenko, E. A. 2018. Abiotic environmental factors affecting the formation of microbial biofilms. *Biology Bulletin*. vol. 45(5): 490–496. <https://doi.org/10.1134/S106235901805014X>.
- Rollet, C., Gal, L., & Guzzo, J. 2008. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 290: 135–142. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x>.
- She, P., Wang, Y., Liu, Y., Tan, F., & Chen, L. 2019. Effects of exogenous glucose on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *MicrobiologyOpen*. vol. 8(e933): 1–15. <https://doi.org/10.1002/mbo3.933>.
- Stewart, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*. vol. 292: 107–113.
- Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., & Onodera, S. 2018. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*. January: 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20485-z>.
- Tam, M., Thi, T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(8671): 1–25. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms21228671>.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2020. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.Eucast.Org>, 0–77. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Table_01.pdf
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. 2016. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. vol. 8451(1): 7–12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>.
- Zou, M., & Liu, D. 2020. Food Science and human wellness effects of carbon sources and temperature on the formation and structural characteristics of food-related *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Food Science and Human Wellness*. vol. 9(4): 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.05.007>.