

Pengaruh Lama Inkubasi Terhadap Produksi Biofilm Secara *In Vitro* oleh *Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Pasien Infeksi Saluran Kencing yang Menjalani Perawatan RSUD Provinsi NTB.

Agrijanti¹, Siti Karyani², Nurul Inayati¹, Lale Budi Khusuma Dewi¹

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Mataram, Indonesia

²Dinas Kesehatan Kota Mataram

ABSTRACT

Biofilms mainly belong to pathogenic bacteria, and knowledge of biofilms is useful as a treatment strategy. Research on biofilm production by local strains is still rare, including *Staphylococcus aureus* which is associated with resistance to antibiotics. This in vitro research examines biofilm production by *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infection patients undergoing treatment at the NTB Provincial Hospital. This research uses incubation time as a factor that influences the formation of *Staphylococcus aureus* bacterial biofilm. The incubation times were 0, 12, 24, 36 and 48 hours. Biofilm formation is the result of reading using the biofilm attachment method on a microplate reader or microtiter plate biofilm assay, which will then be read optical density and tested/analyzed the data with a one-way ANOVA test followed by a TUKEY HSD post hoc test ($\alpha = 0.05$). The optical density results show an increase which also means an increase in biofilm formation along with increasing incubation time. The conclusion that can be drawn from this research is that the length of incubation or culture age has an influence on increasing the formation of *Staphylococcus aureus* bacterial biofilms in vitro.

Keyword: Incubation Time, Biofilm, *Staphylococcus aureus*, Urinary Tract Infection

Article Info

Article history:

Received
October 7, 2023
Revised
October 22, 2023
Accepted
December 20, 2023

ABSTRAK

Biofilm terutama dimiliki oleh bakteri patogen, dan pengetahuan biofilm bermanfaat sebagai strategi pengobatan. Penelitian terhadap produksi biofilm oleh strain lokal masih jarang dilakukan, termasuk *Staphylococcus aureus* dikaitkan dengan sifat kekebalan terhadap antibiotik. Penelitian ini secara in vitro meneliti tentang produksi biofilm oleh *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari pasien infeksi saluran kencing yang menjalani perawatan RSUD Provinsi NTB. Penelitian ini menggunakan lama inkubasi sebagai faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Lama inkubasi yang dilakukan adalah 0, 12, 24, 36 dan 48 jam. Pembentukan biofilm merupakan hasil dari pembacaan menggunakan metode perlekatan biofilm pada *microplate reader* atau *microtiter plate biofilm assay* yang selanjutnya akan dilakukan pembacaan *optical density* dan dilakukan pengujian / analisa data dengan uji *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc TUKEY HSD* ($\alpha = 0,05$). Hasil *optical density* diketahui adanya kenaikan yang juga berarti terjadi kenaikan pembentukan biofilm seiring dengan bertambahnya lama inkubasi. Kesimpulan yang bisa diambil pada penelitian ini adalah bahwa lama inkubasi atau umur biakan mempunyai pengaruh terhadap peningkatan pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro.

Kata Kunci : Lama Inkubasi, Biofilm, *Staphylococcus aureus*, Infeksi Saluran Kemih

Pendahuluan

Biofilm ialah kumpulan bakteri yang menempel satu sama lain yang disatukan oleh jaringan ekopolisakarida. Fungsi biofilm bagi bakteri ialah sebagai pertahanan bakteri untuk tetap tumbuh pada lingkungan, baik lingkungan pada makhluk hidup maupun di alam bebas. Bagi manusia biofilm merupakan salah satu penyebab luka menjadi sulit sembuh karena bakteri mampu bertahan terhadap sistem imun manusia sehingga bakteri menjadi lebih kebal terhadap antimikroba (Steward, 2002). Pada tahun 1973, Characklis menemukan ekopolisakarida dalam sistem air industri sehingga mikroba menjadi aktif, dan tahan terhadap desinfektan klorin dan pembentukan biofilm tersebut resistensi antibiotik (Homonta, 2016).

Dosen tamu Prof Heny mengatakan pada saat kuliah tamu di FK UGM memberikan pernyataan mengenai perlunya kesadaran pengetahuan mengenai peranan biofilm, pembentukan biofilm dimulai dari produksi matriks ekopolisakarida sehingga bakteri mampu melekat pada permukaan substrat kemudian menyebar keluar matrik sehingga mengarah ke daerah yang kurang padat bakterinya (Nirwana, 2022). Biofilm terutama dimiliki oleh bakteri patogen, dan pengetahuan terkini tentang biofilm banyak bermanfaat sebagai strategi pengobatan (Vestby et al., 2020). (M Novard Fadila Arie, 2018). Pembentukan biofilm juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan misalnya nutrisi *Staphylococcus aureus* Ina CC B4 yang resisten terhadap antibiotik oxacilin (OX) dan rentan terhadap antibiotik amoxicilin clavulanic acid (AMC) dilakukan percobaan suplementasi glukosa 1% dapat meningkatkan secara signifikan produksi biofilm pada *Staphylococcus aureus*, sehingga dapat digunakan sebagai kondisi optimum produksi biofilm dan suplementasi NaCl memberikan hasil yang tidak berbeda nyata (Masrukhin et al., 2021). Dari hasil penelitian penyebab infeksi pada spesimen darah pada pasien anak adalah di RSUP Dr. M. Djamil Padang dalam periode 1 Januari 2014 – 31 Desember 2016 telah ditemukan resisten terhadap ampicilin dan amoksisilin *Klebsiella* sp. dan *Staphylococcus aureus*.

Pada kasus patogenesis rinosinusitis kronik kasus berat dan rekalsitran peranan bakteri biofilm khususnya *Staphylococcus* Sp pada. Terbukti terdapat hubungan pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan derajat penyakit dan kualitas hidup penderita rinosinusitis kronik (Lasminingrum & Boesoirie, 2019). Penelitian terhadap produksi biofilm oleh strain lokal masih jarang dilakukan, termasuk *Staphylococcus aureus* kaitannya dengan sifat kekebalan terhadap antibiotik. Penelitian ini akan mempelajari secara in vitro produksi biofilm oleh *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari pasien infeksi saluran kencing yang menjalani perawatan RSUD Provinsi NTB. Dengan mengetahui pengaruh inkubasi *Staphylococcus aureus* maka akan diperoleh informasi mengenai kemampuan didalam membentuk biofilm dan dapat dijadikan informasi bagi antibiofilm pada daya kerja obat.

Rumusan Masalah dalam penelitian ini ialah apakah produksi biofilm oleh *Staphylococcus aureus* secara in vitro dipengaruhi oleh lama inkubasi. Tujuan Penelitian ialah pertama melakukan pengukuran OD (*optical density*) dalam rangka kuantifikasi pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Kemudian tujuan kedua ialah mengetahui pengaruh lama inkubasi terhadap pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus aureus* isolat klinik. Hipotesis Penelitian terdapat perbedaan jumlah biofilm oleh *Staphylococcus aureus* secara in vitro yang disebabkan oleh lama inkubasi.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Instalasi Litbangkes RSUD Provinsi NTB pada bulan Maret-April 2019. Rancangan Penelitian Penelitian ini merupakan pra eksperimental (*pre experimental designs*) yaitu mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul akibat dari adanya perlakuan tertentu (Notoatmodjo, 2018). Dalam hal ini gejala atau pengaruh timbul akibat lama inkubasi atau umur biakan terhadap jumlah produksi biofilm. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan berbagai umur biakan (T), yaitu T1 : umur biakan 0 jam, T2 : umur biakan 12 jam, T3: umur biakan 24 jam, T4 : umur biakan 36 jam, T5 : umur biakan 48 jam, Masing-masing 3 kali pengulangan Bahan Penelitian berupa Isolat murni *Staphylococcus aureus*, Media nutrient broth, Lempeng Nutrien Agar, Larutan *Ciprofloxacin* 5 ug/mL. Alat dan Media Penelitian Mikroplate, Cawan petri, Ose, Inkubator, Spektrofotometer, Autoklaf, Mikroskop.

Variabel bebas adalah umur biakan atau lama inkubasi, dan Variabel terikat ialah jumlah produksi biofilm. Cara pengumpulan data ialah Data dikumpulkan melalui pengamatan menggunakan alat dan secara visual hasil pengamatan yang memuat kuantitas produksi biofilm, *Optical density* dari tingkat kekeruhan dari biakan *Staphylococcus aureus*. Jenis dan Skala Data : data yang diperoleh merupakan data semi kuantitatif dan interval. Cara Kerja. Sub-kultur *Staphylococcus aureus* pada permukaan media nutien agar, diinkubasi pada 37° derajat Celsius. Setelah diperoleh koloni, dilakukan pengecatan gram dan uji biokimia untuk konfirmasi ada tidaknya kontaminan. Koloni murni selanjutnya dibuat suspense dalam media *Tyriptic Soy Broth* (TSB) dengan kekeruhan 0,5 McFarland. Kuantifikasi Biofilm *Microtitter plate biofilm assay* atau *Tissue Culture Plate Adherence Methods* adalah metode untuk deteksi biofilm yang dikemukakan oleh Christenson sebagaimana dikutip dalam Neopane et al (2018), secara singkat dapat dijelaskan sebagai berikut :Koloni *S. aureus* diambil dari lempeng agar dan diinokulasikan kedalam 2 ml TSB kemudian diinkubasi semalam pada temperature 37°C biakan kemudian diencerkan 1:100 dalam media TSB yang baru, sebuah mikro plate 96 sumur diisi dengan 200 mikro liter media TSB, mikroplate kemudian diinkubasi 37°C selama 0, 12, 24, 36 dan 48 jam. Sesudah inkubasi isi dari tiap sumur diambil dengan cara ditumpah sumur kemudian dicuci menggunakan 200 mikro liter PBS (ph 7,3) biofilm yang terbentuk oleh bakteri melekat pada sumur difiksasi menggunakan 99% methanol dan diwarnai dengan 0,1% cristal violet. Kelebihan noda dicuci dengan lembut, dan piring disimpan untuk pengeringan. Kepadatan optik dari biofilm adheren yang ternoda diukur menggunakan *micro-ELISA auto-reader* (Thermo, USA) pada panjang gelombang 570 nm. Percobaan dilakukan dalam tiga kali ulangan.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

Uji konfirmasi dilakukan dengan tiga pengujian, yaitu : pewarnaan gram, uji katalase dan uji koagulase. Pewarnaan gram merupakan uji yang dilakukan secara fenotip untuk membedakan antara bakteri gram negatif dengan bakteri gram positif berdasarkan struktur dinding selnya. Hasil dari metode ini merupakan warna ungu pada bakteri gram positif dan warna merah pada bakteri gram negatif. Warna tersebut muncul dari zat pewarna yang ditambahkan pada saat proses pewarnaan. Warna ungu berasal dari kristal violet dan warna merah berasal dari safranin. Bakteri Gram positif akan mempertahankan zat pewarna kristal violet dan akan tampak berwarna ungu tua di bawah mikroskop. Bakteri gram negatif akan kehilangan zat pewarna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol dan pada saat pemberian zat pewarna safranin akan tampak berwarna merah. Perbedaan warna ini disebabkan oleh perbedaan dalam struktur dinding selnya. Bakteri gram negatif lebih banyak mengandung lipid pada dinding selnya, sehingga saat pemberian alkohol lipid pada dinding selnya akan meluruh dan akan kehilangan zat pewarna kristal violet. Uji katalase merupakan pengujian yang digunakan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang mempunyai enzim katalase sedangkan spesies *Streptococcus* yang lain tidak mempunyai enzim katalase (Todar, 2000). Kuantifikasi Biofilm Penelitian ini menggunakan lama inkubasi sebagai faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Lama inkubasi yang dilakukan adalah 0, 12, 24, 36 dan 48 jam. Hasil data yang diperoleh dibuat tabel (Tabel 1) merupakan hasil dari pembacaan menggunakan metode perlekatan pada plate atau *microtiter plate biofilm assay* yang selanjutnya akan dilakukan pengujian / analisa data dengan uji one way ANOVA yang dilanjutkan dengan uji post hoc TUKEY HSD ($\alpha = 0,05$).

Tabel 1 Hasil pembacaan Optical Density (OD) pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* melalui metode *Microtiter Plate Biofilm Assay*.

Perlakuan		Optical Density			Rata-rata
Sampel	Inkubasi	1	2	3	
Isolat S. aureus	0 jam	0,370	0,439	0,394	0,401 ^a
Isolat ISK02	12 jam	0,511	0,492	0,532	0,516 ^{ab}
	24 jam	0,656	0,674	0,654	0,661 ^{bc}
	36 jam	0,731	0,710	0,722	0,721 ^{cd}
	48 jam	0,748	0,782	0,764	0,764 ^d

Dari hasil pemeriksaan Analisa data diperoleh bahwa perlakuan inkubasi 0 jam OD berbeda nyata dengan inkubasi 12 jam, dan OD 12 jam berbeda nyata dengan 24 jam dan OD 36 jam berbeda nyata dengan OD 48 jam. OD terendah diperoleh dengan lama inkubasi 0 jam dan tertinggi OD inkubasi 48 jam.

Kesimpulan

Kesimpulan yang bisa diambil pada penelitian ini adalah bahwa lama inkubasi atau umur biakan mempunyai pengaruh terhadap peningkatan pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro.

Daftar Pustaka

- Homenta, H. . (2016). Infeksi Biofilm Bakterial. *Jurnal E-Biomedik*, 4(1), 1–11.
<https://doi.org/10.35790/ebm.4.1.2016.11736>
- Lasminingrum, L., & Boesoirie, S. F. (2019). Hubungan Pembentukan Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan Derajat Penyakit dan Kualitas Hidup Penderita Rinosinusitis Kronik. *Jurnal Sistem Kesehatan*, 4(3), 117–124.
http://jurnal.unpad.ac.id/jsk_ikm/article/view/21241/10015
- M Novard Fadila Arie. (2018). *Gambaran Bakteri Penyebab Infeksi Pada Anak Berdasarkan Jenis Spesimen Dan Pola Resistensinya Di Laboratorium Mikrobiologi RSUP DR . M . Djamil*.
[http://scholar.unand.ac.id/34885/6/Cover dan Abstrak.pdf](http://scholar.unand.ac.id/34885/6/Cover%20dan%20Abstrak.pdf)
- Masrukhin, Setiawan, R., Kusmiati, M., & Saputra, S. (2021). Optimasi Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Melalui Penambahan Glukosa dan NaCl. *Prosiding Biologi Achieving the Sustainable Development Goals with Biodiversity in Confronting Climate Change, November*, 342–347. <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/psb>
- Nirwana. (2022). *Upaya Peningkatan Kesadaran Terkait Biofilm*. FK-KMK UGM.
<https://fkkmk.ugm.ac.id/upaya-peningkatan-kesadaran-terkait-biofilm/>
- Notoatmodjo, S. (2018). *Metodologi Penelitian Kesehatan* (3rd ed.). Rineka Cipta.
- Todar, K. (2000). *Antibiotics*. University of Wisconsin. Madison.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Live L. Nesse. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 9(2), 59. <https://doi.org/Antibiotics>