

## PERTUMBUHAN BIOFILM ESCHERICHIA COLI PADA MEDIA TRYPTIC SOY BROTH

Khairunnida Rahma<sup>1</sup>, Juen Carla Warella<sup>2</sup>

Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman<sup>1</sup>, Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura<sup>2</sup>

[khairunnida.rahma@fk.unmul.ac.id](mailto:khairunnida.rahma@fk.unmul.ac.id)

### Abstract

Microorganisms develop many different types of defence mechanisms. One of them is the formation of biofilm. Biofilms are collections of heterogeneous surface-associated microorganisms enveloped in a self-produced polymer matrix consisting of polysaccharides, proteins, and DNA. The aim of this research was to analyse the growth of the Gram-negative *Escherichia coli* biofilm on Tryptic Soy Broth media. The method used was a 96 wells microtiter plate with the addition of 1% glucose. Six replications were carried out and Optical Density (OD) was read using an ELISA reader at a wavelength of 570 nm. The research results showed that the mean OD was 2.810 with a standard deviation of 0.402. It can be concluded that *Escherichia coli* is included in the category of strong biofilm-forming bacteria.

### Article History

Submitted: 23 February 2024

Accepted: 26 February 2024

Published: 4 March 2024

### Key Words

Biofilm, *Escherichia coli*, Tryptic Soy Broth

### Abstrak (Indonesia)

Mikroorganisme mengembangkan berbagai tipe mekanisme pertahanan yang berbeda-beda. Salah satunya adalah pembentukan biofilm. Biofilm merupakan kumpulan dari mikroorganisme terkait permukaan yang heterogen terselubuh di dalam matriks polimer yang diproduksi sendiri yang terdiri dari polisakarida, protein, dan DNA. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pertumbuhan biofilm bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* pada media *Tryptic Soy Broth*. Metode yang digunakan adalah microtiter-plate 96 wells. Dilakukan sebanyak enam kali replikasi dan pembacaan *Optical Density* (OD) menggunakan ELISA reader pada Panjang gelombang 570 nm. Hasil penelitian didapatkan rerata OD 2,810 dengan standar deviasi 0,402. Sehingga dapat ditarik kesimpulan, *Escherichia coli* termasuk ke dalam kategori bakteri pembentuk biofilm yang kuat.

### Sejarah Artikel

Submitted: 23 Februari 2024

Accepted: 26 Februari 2024

Published: 4 Maret 2024

### Kata Kunci

Biofilm, *Escherichia coli*, Tryptic Soy Broth

## Pendahuluan

Mikroorganisme mengembangkan berbagai tipe mekanisme pertahanan yang berbeda-beda seperti pengaturan pertumbuhan, heterogenitas dalam populasi, sistem proteolitik dan lainnya untuk beradaptasi pada kondisi stress. Salah satunya adalah pembentukan biofilm (Kumar et al., 2017). Biofilm merupakan kumpulan dari mikroorganisme terkait permukaan yang heterogen terselubuh di dalam matriks polimer yang diproduksi sendiri yang terdiri dari polisakarida, protein, dan DNA. Beberapa faktor seperti mekanisme pertahanan bakteri, area kolonisasi yang sesuai, keuntungan terkait hubungan dengan lingkungan, dan mode khusus untuk pertumbuhannya meningkatkan pembentukan biofilm (Jefferson, 2004).

◆ Biofilm dapat terbentuk dari satu, dua, atau banyak spesies mikroorganisme dan dapat membentuk struktur lapis tunggal atau struktur tiga dimensional. Biofilm yang sempurna mewakili ekosistem◆ yang sangat terorganisir dengan saluran air yang berpencair untuk memastikan pergantian nutrien, metabolit, dan produk sisa (Sauer, Rickard and Davies, 2007). Proses yang dinamis dari pembentukan biofilm didominasi karakterisasinya oleh pelekatan awal yang reversible dari sel-sel planktonik, agregasi sel dan kolonisasi permukaan, pematangan biofilm dan pelepasan sel-sel dari biofilm ke keadaan planktonik (Makovcova et al., 2017).

Bakteri pada biofilm akan lebih terlindungi dari berbagai stress dibandingkan sel-sel planktonik yang tumbuh secara eksponensial. Efek perlindungan ini tidak hanya kepada aksi sistem imun, akan tetapi juga kepada agen antimikroba (resistensi). Resistensi akan meningkat apabila banyak spesies bakteri maupun jamur hadir membentuk biofilm (Burmølle et al., 2014). Pada biofilm, resistensi tidak harus melibatkan mekanisme transfer gen yang mengkode resistensi antibiotik atau didapatkan secara langsung, akan tetapi lebih bergantung terhadap kemampuan lingkungan untuk bekerjasama dalam menghadapi paparan agen antimikroba. Menurut Elias dan Banin (2012), salah satu mekanisme yang meningkatkan resistensi antibiotik melibatkan perubahan komposisi dari matriks substansi polimerik ekstraseluler (Extracellular Polymeric Substances, EPS).

## Metode Penelitian

### Pembuatan Media TSB

Pembuatan medium Tryptic Soy Broth (TSB) mengacu pada petunjuk pembuatan yang tertera di bagian belakang botol medium.

1. Menyiapkan alat dan bahan.
2. Menimbang sebanyak 30 gram TSB menggunakan neraca analitik.
3. Memasukkan 1000 ml Aquadest ke dalam gelas kimia 1000 ml dan mencampurkan TSB ke dalamnya.
4. Memasukkan stirrer ke dalam gelas kimia dan memanaskannya di atas hotplate selama 15 menit dengan suhu 120<sup>0</sup> C.
5. Memasukkan larutan TSB ke dalam labu Erlenmeyer dan menyumbatnya dengan kassa kapas.
6. Melakukan sterilisasi dengan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121<sup>0</sup> C.
7. Menyimpan medium steril sampai digunakan selanjutnya.

### Pembuatan Suspensi Bakteri

Pengujian antibiofilm menggunakan nanopartikel perak mengacu pada Stepanović et al. (2007).

1. Menyiapkan alat dan bahan.
2. Memasukkan 3-4 koloni bakteri uji menggunakan jarum ose steril ke dalam tabung reaksi yang berisi Tryptic Soy Broth (TSB) sebanyak 5 ml.

3. Menginkubasi di dalam inkubator selama 18 jam pada suhu 35<sup>0</sup> C.
4. Menghomogenkan suspensi dengan menggunakan vortex.
5. Mengencerkan suspensi dengan menggunakan metode dilusi 1:100 dengan medium TSB.

## Uji Pembentukan Biofilm

Pengujian pembentukan biofilm mengacu pada Stepanović et al. (2007) dengan modifikasi.

## Kultivasi Biofilm

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Memasukkan 100 µl suspensi bakteri uji ke dalam sumuran microplate.
3. Setiap rancangan perlakuan dimasukkan ke dalam 3 sumuran (triplicate).
4. Menutup microtiter plate dan menginkubasi selama 24 jam pada suhu 35<sup>0</sup> C.

## Pencucian Microtiter Plate

5. Membuang isi larutan di dalam microtiter plate ke dalam wadah yang sudah disiapkan.
6. Mencuci microtiter plate sebanyak 3 kali dengan 300 µl larutan Phosphate-Buffer Saline (PBS) menggunakan micropipet.
7. Menepuk-nepuk microtiter plate pada setiap kali proses pencucian untuk mengeluarkan larutan yang ada dalam sumuran.
8. Mengeringkan microtiter plate dalam keadaan terbalik.

## Pewarnaan Biofilm

9. Mewarnai biofilm yang terbentuk pada microtiter plate dengan menggunakan larutan kristal violet untuk pewarnaan Gram.
10. Mendiamkan selama 15 menit.
11. Mengambil larutan pewarna dengan menggunakan pipet.
12. Mencuci sisa pewarna dengan menggunakan air mengalir. Pencucian dilakukan sampai air cucian tidak berwarna ungu lagi.
13. Mengeringkan microtiter plate pada suhu ruang.
14. Setelah kering, memecahkan kembali (resolubilized) warna yang terikat dengan sel-sel biofilm dengan cara menambahkan 150 µl etanol 95% pada setiap sumuran.
15. Menutup microtiter plate untuk mengurangi penguapan dan mendiamkannya selama 30 menit.

## Pengukuran Hasil

16. Densitas optik (OD) dari setiap sumuran yang telah diwarnai diukur nilai absorbansinya menggunakan microtiter plate reader pada panjang gelombang 570 nm.
17. Mencatat hasil yang didapatkan.
18. Melakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

### Interpretasi Hasil

Selanjutnya untuk menginterpretasikan hasil, digunakan rumus dan perbandingan yang dijelaskan oleh Stepanović et al. (2007). Nilai OD bakteri dihitung menggunakan rumus:

$$\text{OD Bakteri} = \text{OD kontrol negatif} + 3 \times \text{SD kontrol negatif}$$

Nilai densitas optik setelah perhitungan tersebut selanjutnya dibandingkan menggunakan perbandingan sebagai berikut:

1. OD bakteri  $\leq$  OD cut-off = bukan pembentuk biofilm.
2. OD cut-off  $<$  OD bakteri  $\leq 2 \times$  OD cut-off = pembentuk biofilm lemah.
3.  $2 \times$  OD cut-off  $<$  OD bakteri  $\leq 4 \times$  OD cut-off = pembentuk biofilm sedang.
4. OD bakteri  $>$   $4 \times$  OD cut-off = pembentuk biofilm kuat.

### Hasil dan Pembahasan

Pengujian pertumbuhan biofilm menggunakan satu jenis bakteri Gram-negatif yaitu *Escherichia coli*. Keempat bakteri ditanam pada microtiter plate tanpa diberikan penambah apa pun selain media pertumbuhan. Sebagai kontrol negatif digunakan media pertumbuhan tanpa diinokulasi dengan bakteri apa pun. Adapun hasil yang didapatkan disajikan pada tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm

Bakteri	Replikasi						Rata-Rata	SD
	1	2	3	4	5	6		
<i>Escherichia coli</i>	2,664	3,095	3,353	3,345	2,817	2,340	2,936	0,402
Kontrol Negatif							0,051	0,126

Nilai akhir densitas optik yang digunakan untuk interpretasi hasil didapatkan dari pengurangan rata-rata nilai densitas optik (*OD value*) dengan nilai densitas optik kontrol negatif (*OD cut-off*). Nilai *OD cut-off* (*ODc*) didapatkan dengan melakukan perhitungan rata-rata OD kontrol negatif yang ditambahkan dengan 3 kali standar deviasi kontrol negatif. Keseluruhan nilai OD bakteri menunjukkan nilai yang lebih besar dibandingkan nilai OD cut-off (2,810). Sehingga dapat dikatakan, bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* ini merupakan pembentuk biofilm yang kuat.

Menurut Sharma et al. (2016), terdapat empat tahapan utama yang terlibat dalam pembentukan biofilm yaitu sebagai berikut:

#### 1. Pelekatan Awal (*Reversible*).

Biofilm dapat terbentuk pada lingkungan yang beragam dengan syarat lingkungan yang mencukupi. Selain itu, kondisi lingkungan seperti temperatur, pH dan tekanan ionik dari medium juga berpengaruh dalam pembentukan biofilm. Motilitas juga merupakan faktor penting untuk pelekatan. Akan tetapi pada bakteri non-motil, tetap dapat melakukan pelekatan di permukaan dengan adanya ekspresi faktor pelekatan yang kuat (Beloin, Roux and Ghigo, 2008). Pada tahap

ini sel bakteri berupa sel planktonik. Pelekatan sel planktonik di permukaan ini tidak bersifat permanen dan bakteri yang motil masih memiliki alat gerak seperti flagela serta pili pada tahap ini (Arunasri and Mohan, 2019).

## 2. Pembentukan Awal Struktur Biofilm (*Irreversible*).

Sel bakteri pada mikrokoloni akan mulai memperbanyak diri sebagai akibat dari terjadinya pensinyalan kimia. Sinyal-sinyal kimiawi ini akan aktif saat melewati ambang batas tertentu, mengaktifkan produksi eksopolisakarida dan sel bakteri akan terus membelah di dalam matriks eksopolisakarida (Nazir, Zaffar and Amin, 2019). Beberapa molekul seperti cyclic-diguanylic acid (c-di-GMP) bertanggung jawab dalam proses perubahan sel planktonik menjadi sel yang sesil.

Konsentrasi c-di-GMP rendah pada kondisi motil dan akan meningkat seiring proses pembentukan biofilm berlangsung (Sharma et al., 2016). Pembentukan awal yang bersifat irreversible ini juga dimediasi oleh ekspresi molekul pensinyalan quorum sensing dan oleh pembentukan bahan polimer ekstraseluler. Quorum sensing pada bakteri Gram-negatif sebagian besar dimediasi lewat peptida-peptida kecil dan pada bakteri Gram-positif dimediasi lewat acyl-homoserine lactones (Kumar et al., 2017).

## 3. Pematangan/ Maturation.

Proses maturasi biofilm akan menghasilkan struktur berbentuk tiga dimensi yang di dalamnya terdapat sel-sel yang padat dalam suatu klaster dengan saluran diantaranya yang digunakan untuk transpor air dan nutrisi serta pembuangan limbah sisa (Arunasri and Mohan, 2019). Saat sel sudah melekat dengan kuat di permukaan, sel akan beragregasi melalui interaksi satu sama lain. Autotransporter (untuk interaksi antar sel) dan EPS (untuk pembentukan matriks) merupakan komponen yang sangat penting dalam proses maturasi biofilm.

## 4. Dispersi Sel dari Biofilm Kembali ke Kondisi Planktonik.

Tahapan terakhir dari pembentukan biofilm adalah pelepasan bakteri dari biofilm yang telah matang dan dispersi, yang mana akan mengembalikan bakteri ke keadaan planktonik. Sehingga bakteri dapat berada pada jarak yang jauh dari lokasi awal dan kembali membentuk biofilm baru. Pelepasan dapat terjadi dikarenakan adanya degradasi enzimatis dari matriks biofilm dan quorum sensing sebagai akibat dari perubahan lingkungan yang berhubungan kadar nutrisi dan penipisan oksigen akibat tekanan luar.

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah diuraikan, dapat disimpulkan bahwa bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* ini merupakan pembentuk biofilm yang kuat dengan nilai *optical density* (OD) pada media TSB yang terbaca adalah 2,810.

## Referensi

- Arunasri, K. and Mohan, S. V. (2019). Chapter 2.3-Biofilms, Microbial Electrochemical Technology. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-64052-9.00011-X.
- Beloin, C., Roux, A. and Ghigo, J. (2008). Escherichia coli biofilms - Samenvatting, pp. 249–289.
- Burmølle, M. et al. (2014). Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? , Trends in Microbiology. Elsevier Ltd, 22(2), pp. 84–91. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.004.
- Elias, S. and Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors , FEMS Microbiology Reviews, 36(5), pp. 990–1004. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? , FEMS Microbiology Letters, 236(2), pp. 163–173. doi: 10.1016/j.femsle.2004.06.005.
- Kumar, A. et al. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens , International Journal of Medical Microbiology, 307(8), pp. 481–489. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.09.016.
- Makovcova, J. et al. (2017). Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between Staphylococcus aureus and Gramnegative bacteria , Microbial Biotechnology, 10(4), pp. 819–832. doi: 10.1111/1751-7915.12705.
- Nazir, R., Zaffar, M. R. and Amin, I. (2019) Bacterial biofilms : the remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes, Freshwater Microbiology. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-817495-1.00008-6.
- Sauer, K., Rickard, A. H. and Davies, D. G. (2007). Biofilms and biocomplexity , Microbe, 2(7), pp. 347–353. doi: 10.1128/microbe.2.347.1.
- Sharma, G. et al. (2016). Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies , Journal of Applied Microbiology, 121(2), pp. 309–319. doi: 10.1111/jam.13078.
- Stepanović, S. et al. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates , Apmis, 115(8), pp. 891–899.