

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

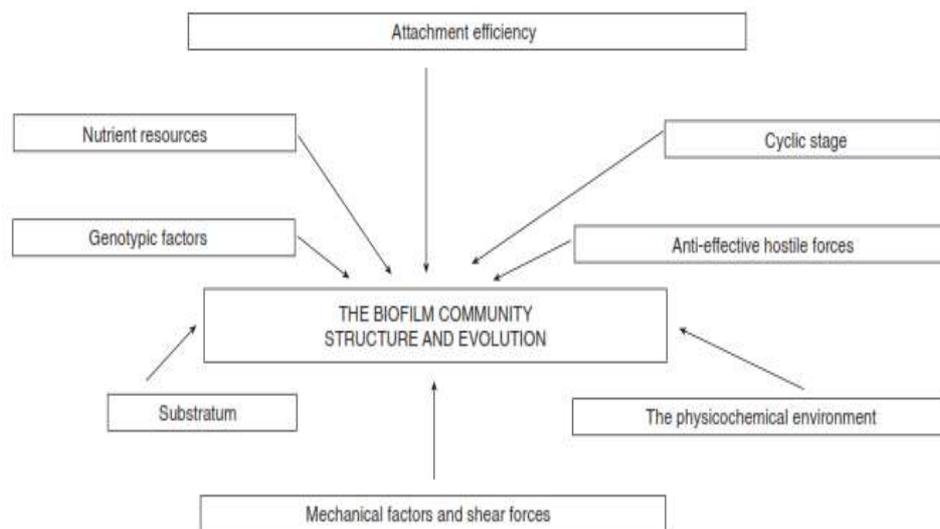
#### **2.1 Biofilm**

Biofilm adalah suatu komunitas yang berisikan mikroorganisme yang melekat pada suatu permukaan padat; dimana permukaan tersebut berupa jaringan hidup maupun jaringan mati (Mahon et al., 2011). Di lingkungan sekitar, bakteri sering membentuk biofilm. Meskipun begitu, penelitian di bidang mikrobiologi terbatas pada pertumbuhan bakteri dalam kondisi buatan yang mana kita ketahui pertumbuhannya hampir tidak memperlihatkan bentukan biofilm secara alami. William J. Costerton, memperkenalkan konsep biofilm dan istilah “biofilm” untuk mikrobiologi pada tahun 1970-an (Costerton et al., 1978). Awalnya penelitian terfokus pada penelitian secara *in vitro* dan “bakteri lingkungan”, dan penelitian biofilm semakin lama semakin meningkat termasuk penelitian pada biofilm “medis” yang terbentuk oleh bakteri patogen selama infeksi (Otto, 2014).

Biofilm adalah merupakan suatu perkembangan biologi organisme dari sel-sel dalam suatu matriks dengan mengoptimalkan sumber nutrisi yang ada, membentuk enzim dimana lingkungan dan aktivitas enzim secara konstan berubah dan berkembang pada kondisi yang tepat. Meskipun banyak komponen membentuk biofilm, kontribusi dari host terhadap mikroorganisme, seperti komponen imunologik dan status fisik mempunyai dampak terhadap struktur biofilm. Beberapa keadaan lingkungan dan karakteristik mengakibatkan pemilihan terhadap

multispesies biofilm yang dapat hidup. Faktor-faktor yang mendasari pembentukan biofilm tersebut adalah (Mahon et al., 2011) :

1. Attachment efficiency
2. Cyclic stage
3. Anti-effective hostile forces
4. The physicochemical environment
5. Mechanical factors and shear forces
6. Substratum
7. Genotypic factors
8. Nutrient resources



Gambar 2.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi perkembangan biofilm (Mahon et al, 2011)

Dari beberapa faktor tersebut, ada empat faktor yang terpenting, yaitu: attachment efficiency, nutrient resources, substrata, dan environment shear stress

or force. Shear stress kemungkinan merupakan faktor yang terpenting memberi dampak pada morfologi dan sifat dari biofilm tersebut

Biofilm memberikan perlindungan terhadap imunitas host termasuk molekul oksigen-reaktif, protein antimikrobial, obat antimikroba, dan fagositosis. Biofilm juga dapat melindungi diri dari pergantian pH dan hilangnya nutrisi. Keuntungan dari biofilm untuk mikroorganisme adalah menghalangi fungsi dari imunitas, terutama aktivitas dari sel darah putih. Sel fagosit, seperti sel polymorphonuclear (PMN), umumnya tidak dapat menembus biofilm dan memfagosit bakteri. Ketika menghadapi biofilm, PMN akan bergranulasi dan menyebabkan kerusakan jaringan host (Mahon et al., 2011).

Mekanisme biofilm dimana dapat melindungi dari antimikroba sehingga menyebabkan resistensi adalah ketidakmampuan senyawa antimikroba untuk melakukan penetrasi diseluruh area biofilm; mengubah aktivitas metabolisme dari bakteri atau mengurangi tingkat pertumbuhan dari bakteri sehingga pemberian antibiotik seperti penicillin hanya dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri yang tumbuh tidak efektif; perbedaan ekspresi gen di dalam lingkungan biofilm yang dapat membuat bakteri dapat melindungi bakteri lainnya dengan memproduksi nutrisi yang dibutuhkan, senyawa yang diinaktifkan oleh antimikroba, atau senyawa penting lainnya yang dapat meregulasi fungsi dari lingkungan biofilm. Secara garis besar, patogenitas dari biofilm adalah:

1. melekat pada permukaan
2. meningkatkan efisiensi metabolik dari komunitas bakteri sendiri
3. menghindari pertahanan dari tubuh host seperti fagosit

4. mendapatkan kepadatan yang tinggi dari mikroorganisme
5. adanya pertukaran gen yang dapat menghasilkan strain virulensi *E. faecalis*
6. menghasilkan konsentrasi besar dari toksin
7. melindungi dari agen antimikroba
8. perlekatan organisme yang berpindah pada bagian tubuh lainnya.

(Mahon et al., 2011)

## 2.2 Extracellular Polymeric Substance (EPS)

Matriks dari biofilm mengandung extracellular polymeric substance (EPS), protein dan DNA; EPS terdiri dari 50-90 % karbon organik di dalam matriks. Biofilm terhidrasi dengan cairan yang memenuhi saluran di sekeliling biofilm. Saluran yang penuh dengan cairan memfasilitasi pergantian nutrisi dan membuang banyak limbah. Ditambah lagi, mikroorganisme yang motile dapat ditemukan di dalam cairan tersebut.

Tabel 2.1 Komponen biofilm

Komponen	Persentasi dari Matrix
Air	Lebih dari 97%
Sel Mikroba	2% sampai 5% , Banyak spesies
Exopolysakarida	1% sampai 2%
Protein	Lebih dari 1% sampai 2%
DNA dan RNA	Lebih dari 1% sampai 2%

(Mahon et al., 2011)

Lapisan biofilm matur terdiri atas tiga lapisan. Lapisan paling luar dari biofilm adalah lapisan yang paling terekspos dengan konsentrasi dari nutrisi dan oksigen. Lapisan ini mengandung organisme yang paling aktif yang hampir sama strukturnya dengan organisme planktonic. Meskipun mikroorganisme ini bagian dari EPS, tapi mikroorganisme ini mulai mengelupas dari formasi biofilm.

Lapisan kedua adalah lapisan intermediate. Lapisan ini memiliki regulasi yang berkurang dalam hal metabolisme, tetapi masih memiliki kapasitas dalam memanfaatkan nutrisi, pertukaran gen, dan memiliki potensi terjadinya resistensi banyak antibiotik. Lapisan paling dalam adalah lapisan yang dekat dengan substratum dan memperlihatkan bagian awal terbentuknya biofilm. Pada lapisan ini juga didapatkan regulasi yang menurun serta sedikit metabolisme yang aktif (Mahon et al., 2011).

### **2.3 Resistensi Biofilm terhadap Antibiotik**

Umumnya, resistensi terhadap obat atau logam berat mengandung arti bahwa bakteri dan bentukan dari kultur atau koloni dapat tumbuh pada keberadaan obat atau logam berat tertentu. Toleransi, disisi lain, mengacu pada situasi dimana bakteri tidak dapat dihilangkan dengan terapi. Apakah itu resistensi ataupun toleransi, keduanya dapat memberikan kontribusi pada kenyataan bahwa pertumbuhan biofilm membuat bakteri dapat hidup terhadap tekanan 1000 kali lipat pada konsentrasi antibiotik lebih tinggi dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri lainnya (Anwar et al., 1990). Dengan kata lain, mekanisme dasar yang bertanggung jawab untuk resistensi biofilm adalah multifaktor, dan di dalam literatur (yang terdapat pada buku-buku terbaru), pengarang biasanya tidak membedakan antara resistensi dan toleransi, karena mekanisme dasar dari konteks biofilm itu sendiri masih belum diketahui. Penetrasi senyawa antimikroba ke dalam lapisan biofilm dibatasi yang berkaitan dengan resistensi antibiotik. Hal ini khusus terjadi pada beberapa senyawa antibiotik seperti golongan Aminoglikosida, kecuali

Fluoroquinolon. Terbatasnya penetrasi dalam bentuk terikat molekul dipengaruhi oleh matriks EPS, yang diyakini menjadi jenuh pada beberapa tempat, sehingga penetrasi secara langsung terjadi. Selain itu, EPS kemungkinan secara konstan memproduksi, menciptakan tempat baru untuk pengikatan antimikroba.

Faktor lainnya terjadinya toleransi biofilm adalah sangat heterogennya aktivitas metabolik biofilm. Di dalam biofilm, terdapat gradien nutrisi dan oksigen, yang dibatasi pertumbuhan rata-rata kebanyakan sel (kecuali untuk sel yang terdapat pada permukaan lapisan). Target antimikroba adalah sel yang aktif bermetabolisme, sedangkan sel biofilm yang tidak tumbuh sangat sulit untuk menjadi target. Beberapa antibiotik menurunkan aktivitas oksigen untuk berkontribusi ke level yang lebih rendah pada biofilm. Pilihan lainnya adalah ekspresi gen biofilm, menambah resistensi antibiotik (Lewis, 2001)

#### **2.4 Quorum Sensing**

Pembentukan biofilm dipengaruhi oleh signalling yang tergantung kepadatan populasi ( Camili and Bassler, 2006 ; Krasteva et al., 2012). Quorum sensing dan signaling feromon peptida berperan mengkoordinasikan ekspresi gen dan pengembangan biofilm enterococcal secara langsung, kecuali feromon peptida cCF10 yang memediasi transfer plasmid pCF10 konjugatif. Plasmid ini dapat mentransfer gen yang mengkode resistensi antibiotik dan penentu virulensi seperti Agg (Cook, 2014). Transfer pCF10 bergantung pada akumulasi cCF10 yang menginduksi protein yang terlibat dalam konjugasi. Mekanisme yang mendasari regulasi gen ini yang diperantarai oleh feromon peptida dan transfer plasmid (Chen & Wei 2011). Baru-baru ini terbukti transfer pCF10 antara sel *Enterococcus*

faecalis dalam usus mencit. Membran protease Eep memproses feromon peptida immature cAD1 dan cCF10. Eep juga memediasi pemrosesan proteolitik RsiV, yang merupakan faktor anti-sigma untuk SigV, yang mengarah pada peningkatan resistensi terhadap stres lingkungan. Fenotipe mutan sigV konsisten dengan peran Eep dalam regulasi produksi sigV. Eep, bersama AhrC, suatu regulator transkripsional keluarga ArgR, juga berkontribusi terhadap pembentukan biofilm in vitro dan delesi gen yang mengkode baik protein yang dilemahkan kolonisasi dalam model osteomielitis tikus dan mengurangi beban bakteri pada model UTI dan endocarditis. Selain itu, mutan delesi eep membentuk agregat kecil yang tidak khas pada biofilm (Frank, 2012). Sistem quorum sensing lain adalah fsrABC. FsrC adalah sensor membran kinase yang mengenali akumulasi peptida FsrB bergantung dari kepadatan dan mentransduksi sinyal ke regulator respons FsrA (Ali, 2017). Sistem ini mengatur beberapa gen dan operon yang berhubungan dengan biofilm (termasuk bopABCD, ebpABC, gelE dan sprE), Akibatnya, delesi fsrABC sepenuhnya akan menghapuskan pembentukan biofilm ( Hancock and Perego, 2004). Sistem quorum sensing Fsr juga mengatur produksi FsrD, yang merupakan prekursor biosintesis aktivator peptida peptida gelatinase pheromone (GBAP). Produksi autoinducer 2 (AI-2), tergantung pada S-ribosylhomocysteine lyase (LuxS), yang juga terlibat dalam pembentukan biofilm E. faecalis. Suplementasi AI-2 meningkatkan pembentukan biofilm E. faecalis secara in vitro dan delesi luxS menghasilkan pembentukan biofilm yang menyimpang dengan agregat dan struktur padat, berbeda dengan lapisan mono lapisan yang bertipe liar dari biofilm in vitro tipe liar (Ch'ng, 2018).

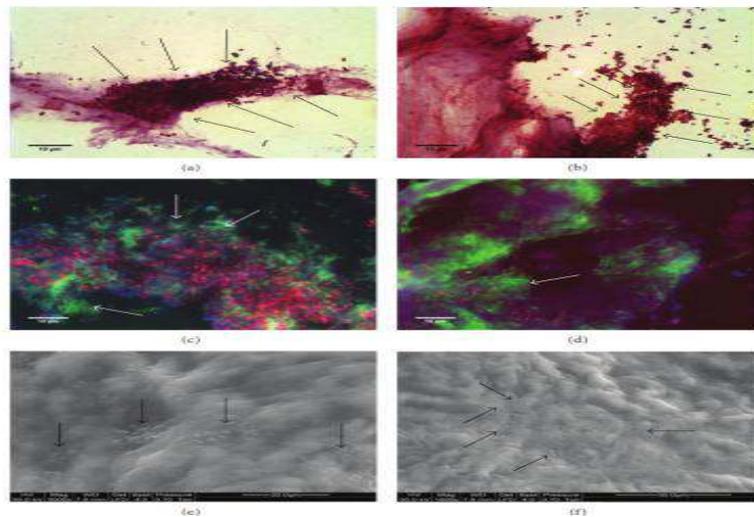
## 2.5 Pemeriksaan Mikroskopis Biofilm

Berbagai teknik pewarnaan yang dapat dilakukan untuk mendeteksi biofilm adalah pewarnaan sederhana sampai dengan pemeriksaan molekuler yang bersifat sangat spesifik. Pada pemeriksaan mikroskop fluoresen, kerumitan pewarnaan termasuk *tissue autofluorescence*, *fixation-induced autofluorescence*, and *nonspecific binding*. Berbagai teknik pemeriksaan mikroskop telah digunakan untuk menggambarkan biofilm dalam jaringan termasuk didalamnya *light microscopy*, *transmission and scanning electron microscopy*, *epifluorescent microscopy*, and *confocal scanning laser microscopy*. *Confocal scanning laser microscopy* merupakan teknik pemeriksaan tambahan yang menggunakan manipulasi seminimal mungkin pada sampel, menghasilkan gambaran 3 dimensi, serta pemeriksaannya lebih spesifik yang bersifat molekuler ( Oates et al.,2014)

Telah diberlakukan kesepakatan untuk sejumlah penyakit infeksi yang berkaitan dengan biofilms, adanya suatu kemampuan/cara untuk mendeteksi biofilm melalui penggambaran dari jaringan yang penting, tidak hanya untuk kepentingan riset tapi juga untuk kepentingan diagnosis dan evaluasi dari pengobatan. Biofilm terdiri dari tiga dimensi yaitu dari komunitas lingkungan dimana terdapat hubungan antara populasi bakteri dan jaringan pada host yang fungsinya sangat penting terhadap biofilms dan interaksinya terhadap sel host. Langkah agregasi multiselular dari pembentukan biofilm dapat diinduksi oleh glukosa (Mack, et al, 1992). Ekspresi pga dan sintesis polisakarida diinduksi oleh glukosa, etanol dan NaCl untuk menghasilkan produksi biofilm pada isolat *Escherichia coli* (Cerca dan Jefferson, 2008).

Menurut Pantanella (2013), untuk menampilkan gambaran spesimen jaringan harus dilakukan manipulasi minimal untuk mempertahankan morfologi biofilms itu sendiri. Bakteri biofilm hidup di dalam suatu extracellular polymeric substances (EPS). Teknik yang ideal untuk menggambarkan biofilm di dalam jaringan dengan cara memvisualisasikan pembungkus EPS beserta sel-sel di dalamnya.

Deskripsi bakteri dan fungi di dalam jaringan selama ini menggunakan metode pewarnaan patologi konvensional. Kenyataannya, histopatologi penyakit infeksi telah memainkan peranan pentingnya dalam mengidentifikasi agen etiologik. Teknik klasik Brown dan Brenn untuk pewarnaan Gram jaringan ternyata membutuhkan serial pembilasan yang bersifat kimia (Gupta et al., 2009) Pemeriksaan biofilm pada luka kaki diabetik menggunakan 3 metode mikroskopis, yaitu pewarnaan gram lalu dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop cahaya, mikroskop fluoresen dan ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mikrokoloni bakteri dan matriks biofilm dapat divisualisasikan dengan menggunakan mikroskop cahaya, mikroskop fluoresen dan ESEM.



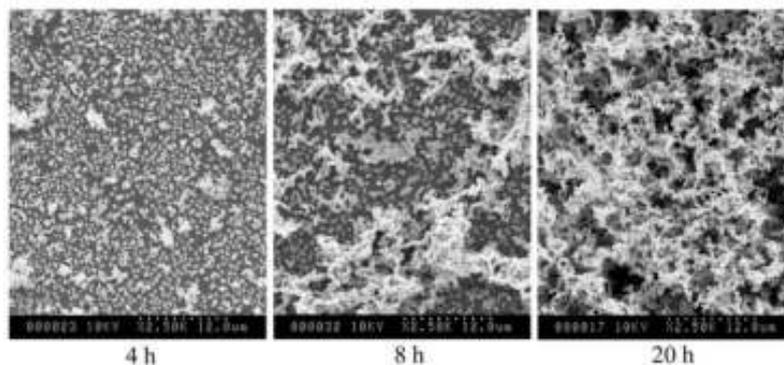
Gambar 2.2 Pencitraan sampel

(a) dan (b) adalah gambar replikat dari pewarnaan Gram; (c) dan (d) (replik) yang divisualisasikan menggunakan kombinasi FISH (merah), yang menunjukkan eubacteria, ConA (hijau) yang menunjukkan matriks biofilm, dan bahan Con-A reaktif lainnya, dan Hoechst 33252 (biru) untuk deteksi asam nukleat. (e) dan (f) menunjukkan gambar ESEM replikat. Dugaan mikrokoloni bakteri bakteri dan matriks biofilm ditunjukkan oleh panah (Oates et al., 2014)

Biofilm dapat dideteksi lebih signifikan dengan menggunakan teknik pewarnaan Gram dan mikroskop fluoresen yang relatif hemat biaya, sederhana tersedia di laboratorium diagnostik rumah sakit, dibandingkan dengan metode Scanning Electron Microscopy (SEM) yang sangat mahal dan lebih banyak diperuntukkan untuk suatu penelitian (Oates et al., 2014).

Menurut (Kristich et al., 2003), SEM dapat digunakan untuk memonitor struktur dari biofilm *E. faecalis* OG1RF. *E. faecalis* OG1RF adalah strain bebas plasmid yang mengandung beberapa elemen seluler namun tetap mempertahankan karakteristik ketahanan hidup yang kuat, resistensi antibiotik intrinsik, dan karakteristik sifat virulensi dari sebagian besar genotipe *E. faecalis* (Dale et al, 2018). Hasilnya menunjukkan bahwa formasi biofilm *E. faecalis* OG1RF melewati

stase biofilm melalui tahapan perlekatan dari sel individu, pembentukan mikrokoloni (Gambar 2.3) dan perkembangan biofilm matur, kemudian *E. faecalis* OG1RF dapat menghasilkan densitas biofilm padat yang menunjukkan arsitektur biofilm yang khas tanpa adanya ESP gen.



**Gambar 2.3** Analisis SEM biofilm *E. faecalis* OG1RF  
(Kristich et al., 2003)

## 2.6 Metode Pemeriksaan Biofilm Secara Kualitatif

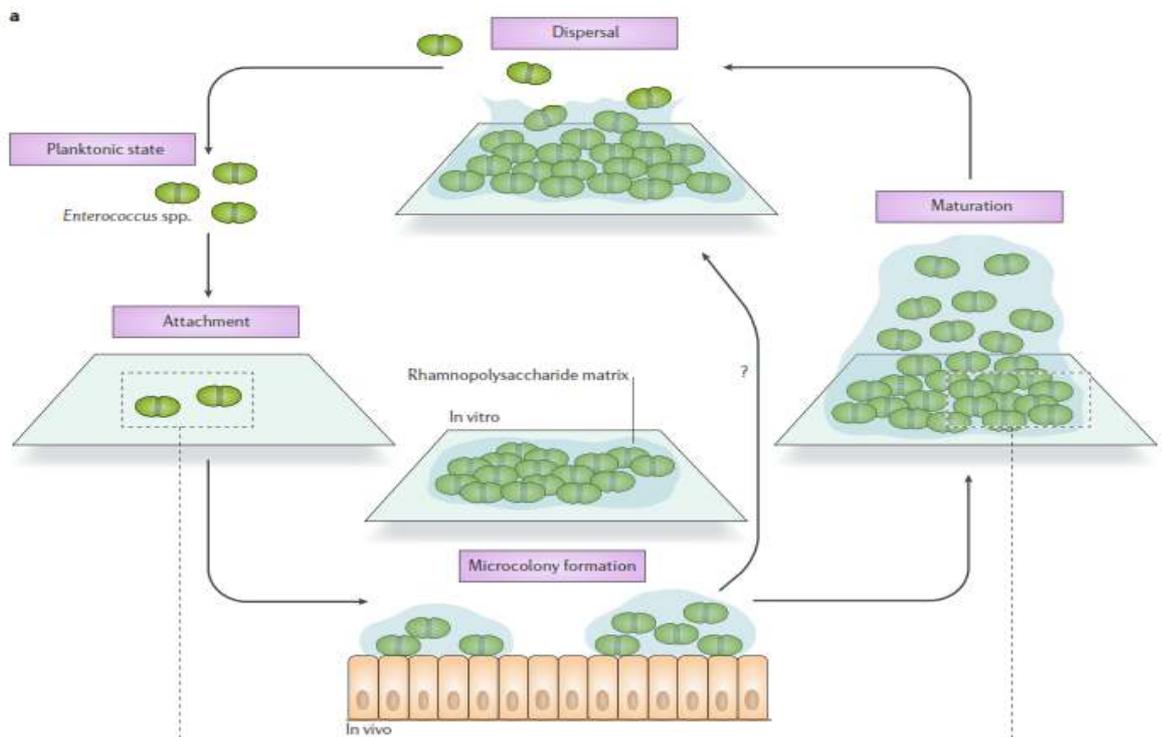
Berdasarkan beberapa jurnal terbaru dinyatakan bahwa terdapat banyak metode pemeriksaan untuk mendeteksi biofilm. Diantara metode tersebut, terdapat 3 metode terbaik untuk mendeteksi biofilm ini, yaitu: Microtiter Plate Assay (MPA) atau Tissue Culture Plate (TCP), Tube Method (TM) atau Test Tube (TT), Congo Red Agar (CRA) (Mathur et al., 2006; Hassan et al., 2011). Pada suatu Penelitian yang dilakukan di Departemen Mikrobiologi, Army Medical College, National University of Sciences and Technology, Pakistan, yang berlangsung dari Januari 2010 sampai Juni 2010 sebanyak 110 isolat klinis menjadi sasaran metode deteksi biofilm. Isolat diidentifikasi menggunakan standar prosedur mikrobiologi. Deteksi biofilm diuji dengan MPA, TM dan CRA, disertai uji sensitivitas antibiotik. Uji sensitivitas antibiotik dilakukan dengan menggunakan teknik difusi cakram Kirby-

Bauer sesuai dengan pedoman CLSI. Hasil penelitian ini menyatakan bahwa metode MPA dianggap lebih unggul dibandingkan dengan Metode TM dan CRA. Dari total 110 isolat klinis diperoleh hasil Metode MPA menunjukkan bahwa 22,7% sampel dinyatakan memproduksi biofilm kuat, 41% produsen biofilm moderat dan 36,3% dinyatakan tidak memproduksi biofilm (Hassan et al., 2011). Keunggulan Metode TM dan CRA dibandingkan dengan Metode MPA adalah lebih mudah aplikasinya di laboratorium diagnostik.

Menurut Institut Kesehatan Nasional, lebih dari 80% dari semua infeksi melibatkan biofilm. Biofilm dikaitkan dengan banyak kondisi medis termasuk peralatan medis yang tinggal, plak gigi, infeksi saluran pernapasan atas, peritonitis, dan infeksi urogenital. Bakteri Gram-positif maupun bakteri Gram-negatif diketahui memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm. Bakteri pembentuk biofilm tersebut antara lain: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Reid G, 1999).

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa metode MPA merupakan gold standard untuk uji produksi biofilm. Parameter seperti sensitivitas, spesifisitas, negative predictive value, positive predictive value dan akurasi telah diuji (Hassan, 2011). Namun demikian beberapa peneliti juga mulai memodifikasi teknik-teknik deteksi biofilm yang lain yang lebih mudah dan murah agar hasilnya lebih obyektif dengan capaian sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi pula (Mariana et al., 2009; Kaiser et al., 2012).

## 2.7 Pembentukan biofilm pada *Enterococcus faecalis*



**Gambar 2.4** Tahapan pengembangan biofilm Enterococci (Ch'ng, 2018)

Pembentukan biofilm *Enterococcus faecalis* dimulai dengan sel-sel planktonik yang menempel pada permukaan dalam proses yang melibatkan adhesin, termasuk endokarditis dan pilus terkait biofilm (Ebp), zat agregasi (Agg), protein permukaan enterococcal (Esp), adhesin ke kolagen dari *E. faecalis* (Ace), protease dan glikolipid. Setelah perlekatan, mikrokoloni terbentuk, dan rhamnopolysaccharide diproduksi (secara in vitro, *E. faecalis* biasanya membentuk lembaran biofilm). Beberapa mikrokoloni mungkin mudah terdispersi, tetapi yang lain dapat berkembang lebih lanjut menjadi biofilm matur dengan matriks yang lebih tebal dan lebih kompleks (gambar a dan b). Biofilm Enterococcal matur ditandai oleh akumulasi DNA ekstraseluler (eDNA), polisakarida, protease ekstraseluler, termasuk autolysin AtIA, gelatinase (GelE) dan serine protease (SprE), dan asam lipoteichoic (LTA) dalam matriks. Faktor-faktor yang mendorong perkembangan dari biofilm matur ke tahap penyebaran tidak diketahui, dan tidak jelas apakah mikrokoloni dapat menghilangkan sel planktonik. BgsA, berperan pada sintesis glikolipid A terkait biofilm; sedangkan SalB, merupakan protein B seperti halnya seperti SagA (Ch'ng, 2018)

Penetrasi antibiotik yang rendah melalui matriks biofilm dan keberadaan sel persisten berkontribusi terhadap toleransi antibiotik terhadap biofilm, yang

menyebabkan infeksi persisten. Meskipun sangat sedikit yang diketahui tentang pembentukan sel persisten dalam enterococci, *E. faecalis* membutuhkan alarmone guanosine tetraphosphate (ppGpp) untuk mentoleransi antibiotik yang mengganggu dinding sel (Gaca, 2013). Pada hampir semua bakteri, ppGpp telah dinyatakan memiliki peran sentral dalam pembentukan sel persisten yang diinduksi lingkungan (Maisonneuve, 2014), memperlambat pertumbuhan dengan mengatur secara berbeda 500 gen dalam *Escherichia coli* (Durfee, 2008). Dalam strain VRE yang diisolasi secara klinis dengan mutasi *relA* missense tunggal, respons ketat yang diaktifkan secara konstitutif meningkatkan kadar ppGpp, yang menyebabkan toleransi antibiotik dan eradikasi tertunda (Honsa, 2017). Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menentukan mekanisme yang tepat yang membentuk sel persisten enterococcus dan menentukan perannya dalam persistensi biofilm (Ch'ng, 2018).

## **2.8 Metode Congo Red Agar**

Metode Congo Red Agar (CRA) adalah salah satu metode pemeriksaan biofilm yang lebih mudah dan lebih cepat dikerjakan dibanding pemeriksaan fenotipik lainnya. Namun demikian teknik pemeriksaan ini sedikit kurang tepat dalam identifikasi isolat yang positif menghasilkan biofilm bila dibandingkan dengan teknik analisis molekuler dari gen yang terlibat dalam pembentukan biofilm (Fitzpatrick et al., 2005). Metode CRA ini cepat, mudah, sensitif, reproducible dan koloni yang tumbuh pada medium ini masih dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut (Freeman et al., 1989; Arciola et al., 2002; Kaiser et al., 2012).

Freeman et al. menyatakan bahwa Congo Red Agar merupakan metode kualitatif sederhana untuk mendeteksi produksi biofilm dengan mekanisme kerja berdasarkan kemampuan pewarna media ini untuk memberikan warna hitam pada polisakarida. Untuk membuat Congo Red Agar, disiapkan sukrosa dan Congo Red stain (sukrosa sebanyak 50g / L dan 0.8g / L) ditambahkan ke agar Brain Heart Infusion 37 g ( Devaraj dan Sajjan., 2014). Strain enterococcal diinokulasi pada CRA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan oleh morfologi kristal hitam. Isolat yang memproduksi koloni hitam dianggap sebagai produsen biofilm yang kuat. Koloni gelap tanpa morfologi koloni kristal kering menunjukkan produksi biofilm sedang. Produser biofilm yang lemah menghasilkan koloni merah muda gelap. Produser non-lendir sebagian besar berubah menjadi koloni merah kering. Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga dan diulang tiga kali (Triveda et al., 2016) Mekanisme perubahan warna koloni pada media CRA terjadi karena Congo Red stain akan berinteraksi dengan polisakarida yang merupakan hasil metabolik sekunder dari bakteri dan juga media pertumbuhan sehingga membentuk kompleks warna dengan cat yang menyebabkan koloni tampak berwarna gelap (Arciola et al., 2005). Bakteri memfermentasi gula-gula atau polisakarida yang diperlukan untuk menghasilkan metabolit tertentu, yang berkombinasi dengan Congo red sehingga memberi warna hitam pada koloni yang menandakan terbentuknya biofilm



**Gambar 2.5** Congo Red Agar untuk mendeteksi biofilm pada *Enterococcus.spp* (Costerton, 1995)

## 2.9 Metode Modified Congo Red Agar

Media Modified Congo Red Agar yang terdiri dari Blood agar base (40gm/l); glucose (10 g/l) dan Congo red dye ( 0,4 g/l). Congo red stain disiapkan dengan dilarutkan dalam 100 ml aquades lalu diautoklaf pada suhu 121<sup>0</sup> C selama 15 menit, kemudian bahan tersebut dicampur dengan agar base yang suhunya diperkirakan sudah sekitar 55<sup>0</sup> C diinokulasikan dalam bentuk spot inoculation sejumlah 4µl pada CRA. Lempeng agar tersebut diinkubasi selama 24-48 jam pada 37°C pada kondisi aerob (Nachammai et al., 2016)

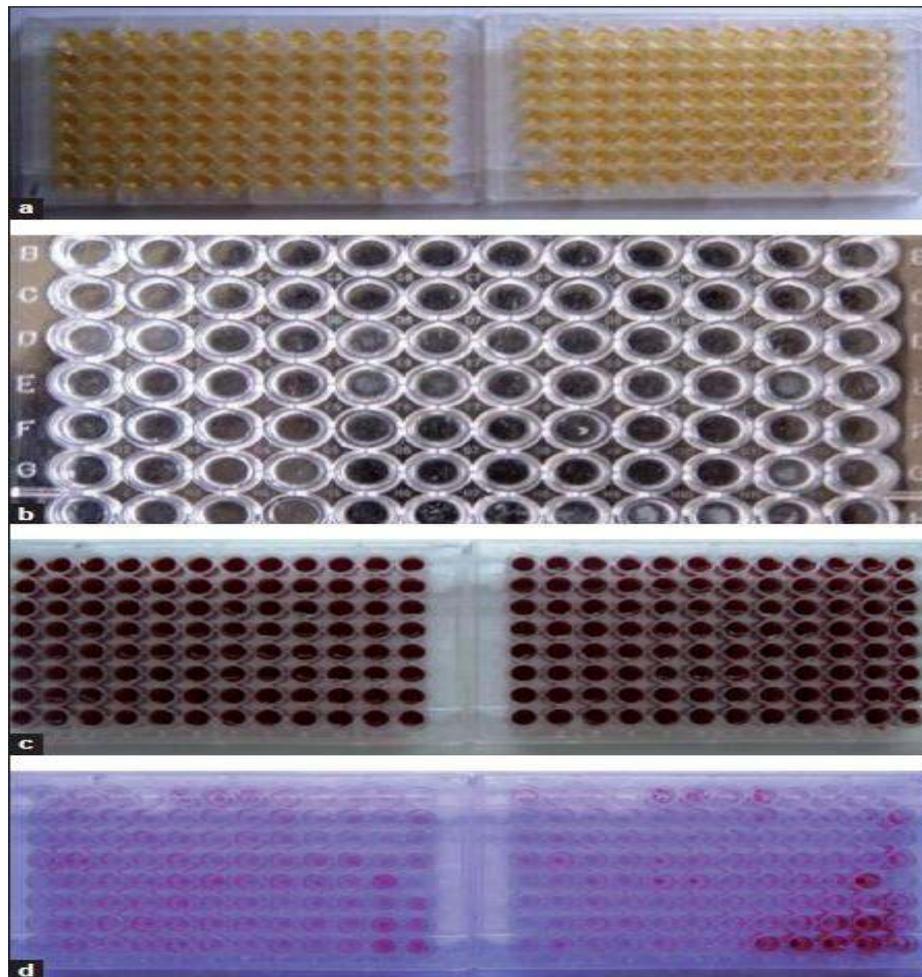
## 2.10 Microtiter Plate Assay (MPA)

Penelitian Christensen et al (1985) menyatakan bahwa metode pemeriksaan biofilm secara kuantitatif dan merupakan pemeriksaan gold standard yang baik untuk mendeteksi biofilm (Christensen et al., 1985). Microtiter plate assay digunakan untuk menguji pembentukan biofilm. Microtiter Plate Polystyrene digunakan untuk mengevaluasi pembentukan biofilm *E. faecalis*, seperti yang dijelaskan sebelumnya untuk cocci Gram positif lainnya (Baldassari, 2001). Isolat yang disimpan -80°C menggunakan media Tryptone Soya Broth (TSB) disubkultur

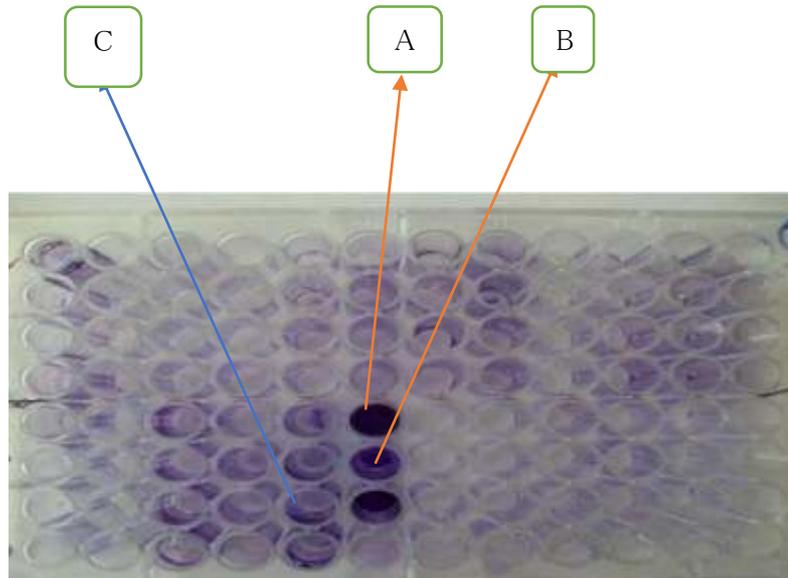
pada Sheep Blood Agar (SBA) selama 24 jam. Beberapa koloni dengan morfologi yang identik dibuat suspensi bakteri sesuai standar 0,5 McFarland menggunakan alat fotometri kemudian suspensi divortex. Setiap sumuran microtiter plate flat - bottomed 96 well polystyrene tissue culture-treated microtiter plate diisi dengan 180µl TSB. Selanjutnya 20 µl suspensi bakteri ditambahkan pada sumuran, plate ditutup dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi isi sumur plate dibuang kemudian setiap sumuran dicuci dengan 300 µl phosphate buffer saline (pH 7,2) sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan posisi terbalik. Biofilm dibentuk oleh bakteri terikat pada sumur, difiksasi dengan 150 µl metanol pada setiap sumuran dan didiamkan selama 20 menit. Mikrotiter dikosongkan dengan cara diketuk lalu dibiarkan dalam posisi terbalik kemudian diwarnai dengan cristal violet (0,1%) selama lima menit, kelebihan cat dicuci dengan air deionisasi dan plate dikeringkan. Optical density (OD) dari bakteri yang terikat dengan pewarnaan dibedakan dengan ELISA autoreader dengan panjang gelombang 595 nm (OD 595nm) (Christensen, 1985 ; Christopher, 2003 ; Shridhar S, 2019).

Dengan sedikit modifikasi pembentukan biofilm dideteksi dengan cara memasukkan isolat ke dalam trypticase soy broth (TSB) dengan glukosa 0,5% dan setelah semalam diinkubasi pada suhu 37 C hasil kultur ini diencerkan 1: 40 ke dalam TSB yang ditambahkan glukosa 0,5%, 200 µL inokulum encer ini ditambahkan ke dalam microtiter plate polistiren steril yang datar. Selanjutnya microtiter plate ditutup dan diinkubasi 37 C selama 48 jam. Microtiter dikosongkan dengan cara diketuk lalu dibiarkan dalam posisi terbalik kemudian diwarnai dengan safranin (0,1%) selama 20 menit, kelebihan cat dicuci dengan air deionisasi dan

plate dikeringkan diudara pada suhu kamar. Plate kemudian dicuci lima kali seperti yang dijelaskan sebelumnya dan dikeringkan. Absorbansi biofilm pada permukaan dasar setiap sumur ditentukan panjang gelombang 490 nm menggunakan ELISA autoreader. Semua strain diinokulasi dalam rangkap tiga di microtiter plate dan semua percobaan diulang tiga kali. Untuk menghitung absorbansi rata-rata, absorbansi untuk masing-masing dari tiga sumur yang diinokulasi dengan strain tinggal dihitung. Semua percobaan juga termasuk tiga sumur kosong (mis., Media kultur tanpa bakteri). Nilai-nilai OD ini dianggap sebagai indeks bakteri yang melekat pada permukaan dan membentuk biofilm. Biofilm yang diproduksi *E. faecalis* OG1RF digunakan sebagai kontrol positif (Uphadayaya, 2010 ; Christopher et al, 2003; Christensen et al, 1985).



**Gambar 2.6** (a) isolat *E. faecalis* diinokulasikan pada microtiter plate yang terdiri dari TSB dengan 0,5% Glukosa; (b) plate *E. faecalis* diinkubasi 48 jam dicuci tiga kali dengan air destilasi; (c) plate yang terdiri biofilm diwarnai dengan 0.1% safranin 20 menit; (d) sumur microtiter plate yang menunjukkan terbentuknya biofilm setelah diwarnai dengan safranin (Uphadayaya, 2010)



Gambar 2.7 Microtiter Plate Methode (MPA), Plate Methode (MTP), A: positif kuat, B: positif /moderate, C: Negative/ tidak ada (Christensen, 1985)

Interpretasi dari produksi biofilm (Stepanovic et al., 2007)

Average OD value	Biofilm production
$\leq \text{ODc} / \text{ODc} < \sim \leq 2x \text{ODc}$	Non/weak
$2x \text{ODc} < \sim \leq 4x \text{ODc}$	Moderate
$> 4x \text{ODc}$	Strong

Optical density cut-off value (ODc) = average OD of negative control + 3x standard deviation (SD) of negative control.

Pembacaan metode MPA menggunakan prinsip kerja spektrofotometri. Spektrofotometri adalah metode untuk mengukur seberapa banyak zat kimia menyerap cahaya dengan mengukur intensitas cahaya ketika seberkas cahaya melewati larutan sampel (Allen et al., 2009). Prinsip dasarnya adalah bahwa setiap senyawa menyerap atau mentransmisikan cahaya pada rentang panjang gelombang tertentu. Pengukuran ini juga dapat digunakan untuk mengukur jumlah zat kimia yang dikenal. Aplikasi apa pun yang berhubungan dengan bahan atau bahan kimia

dapat menggunakan teknik ini. Dalam biokimia, misalnya, digunakan untuk menentukan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Dalam aplikasi klinis, digunakan untuk memeriksa darah atau jaringan untuk diagnosis klinis banyaknya zat kimia menyerap cahaya tergantung pada kisaran panjang gelombang sumber cahaya, sehingga spektrofotometer dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu:

1. UV-visible spectrophotometer : menggunakan cahaya pada rentang ultraviolet (185 - 400 nm) dan rentang visible (400 - 700 nm) dari spektrum radiasi elektromagnetik
2. IR Spektrofotometer : menggunakan cahaya pada rentang inframerah (700 - 15000 nm) spektrum radiasi elektromagnetik.

Pada UV-visible spectrophotometer, penyerapan atau transmisi zat tertentu dapat ditentukan oleh warna yang diamati. Misalnya, sampel solusi yang menyerap cahaya pada semua rentang yang terlihat (tidak mentransmisikan panjang gelombang yang terlihat) tampak hitam dalam teori. Di sisi lain, jika semua panjang gelombang yang terlihat ditransmisikan (tidak menyerap apa pun), sampel larutan tampak berwarna putih. Jika sampel larutan menyerap lampu merah (~ 700 nm), itu tampak hijau karena hijau adalah warna komplementer dari merah. Spektrofotometer yang terlihat, dalam praktiknya, menggunakan prisma untuk mempersempit kisaran panjang gelombang tertentu (untuk menyaring panjang gelombang lainnya) sehingga berkas cahaya tertentu dilewatkan melalui sampel larutan (Ninfa et al, 2010)

Penggunaan spektrofotometri memiliki keuntungan maupun kerugian. Keuntungan terbesar penggunaan spektrometer UV-VIS adalah akurasi perangkat.

Bahkan spektrometer UV-VIS kecil dapat memberikan pembacaan yang sangat akurat. Spektrometer UV-VIS mudah digunakan. Sebagian besar yang digunakan dalam penelitian kimia, sebanding dengan mikroskop elektron dan membutuhkan keterampilan dasar yang sama. Karena mudah dioperasikan, ada sedikit peluang spektrometer UV-VIS digunakan secara tidak benar. Kerugian utama menggunakan spektrometer UV-VIS adalah waktu yang diperlukan untuk mempersiapkan menggunakannya. Dengan spektrometer UV-VIS, ruang harus dibebaskan dari cahaya luar, kebisingan elektronik, atau kontaminan luar lainnya yang dapat mengganggu pembacaan spektrometer. Jika ruang telah dipersiapkan dengan baik sebelumnya, spektrometer UV-VIS mudah digunakan dan memberikan hasil yang akurat. Namun, jika ruang belum disiapkan dengan benar, bahkan sedikit cahaya luar atau getaran dari perangkat elektronik kecil dapat mengganggu hasil spektrometer UV-VIS (Wyphych, 2015)