

Pembentukan Biofilm oleh *Streptococcus uberis* Terkait dengan Infeksi Kronis Intramammary

(Biofilm Formation by *Streptococcus uberis* Associated with Chronic Intramammary Infections)

Vincentius Mubiarto Setiawan*, Soelih Estoepangestie**, Setiawan Koesdarto**

ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the mammary gland and is extremely problematic in the dairy industry. *Streptococcus uberis* is one of the main infectious agents responsible for causing mastitis. We speculate that one of the reasons behind the prevalence of *S. uberis* infections is its ability to form biofilms. The objectives of this study were to determine *in vitro* slime production, biofilm formation and the presence of extracellular matrix associated with biofilm production. Twenty four strains of *S. uberis* isolated from the chronic mastitic cows and were tested by microtiter plate (MTP) and Scanning Electron Microscopy (SEM). *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, was used as a negative control *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus simulans* ATCC 27851 was used as positive control. All 12 strain also displayed a biofilm-phenotype when tested by MP. The strains were further classified as weak (69%) and strong (31%) biofilm formers. The *Streptococcus uberis* strain that show biofilm formation ability was showing the presence of extracellular matrix associated with biofilm production on SEM. In summary, *S. uberis* is capable of forming biofilms *in vitro* on an abiotic surface. The economic impact of Understanding the virulence factors that influence *S. uberis*'s ability to colonize and maintain infections will ultimately allow for effective and appropriate treatment protocols that could greatly decrease the impact of mastitis caused by this pathogen in the dairy industry.

Key words: *Streptococcus uberis*, biofilm, chronic mastitis

PENDAHULUAN

Mastitis merupakan penyakit infeksi yang paling sering ditemukan pada peternakan sapi perah. Penyakit ini sangat merugikan bagi industri peternakan sapi perah karena mengakibatkan penurunan produktivitas ternak (Khan and Khan, 2006). Beberapa metode pengendalian mastitis telah terbukti berhasil terhadap mastitis yang disebabkan oleh bakteri kontagius (*Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus*) tetapi pengendalian mastitis yang disebabkan oleh *Streptococcus uberis* masih belum berhasil dikendalikan, hal ini disebabkan banyaknya infeksi kronis. Kejadian mastitis kronis oleh *S. uberis* dihubungkan dengan kemampuan bakteri tersebut untuk membentuk biofilm *in Vitro* (Moore, 2009; Varhimo et al., 2011).

Biofilm adalah suatu komunitas sel bakteri yang terstruktur dan saling menempel, bakteri-bakteri tersebut

mampu memproduksi matriks polimer dan mampu melekat pada permukaan biologis maupun benda mati (Oliveira et al., 2006; Melchior et al., 2006; Varhimo et al., 2011). Formasi ini membuat bakteri pembuat biofilm mampu bertahan terhadap lingkungan ekstrim yang membahayakan bakteri tersebut. Bakteri di dalam biofilm mampu bertahan terhadap antibiotik, desinfektan, bahkan mampu tahan terhadap sistem immunitas hospesnya (Oliveira et al., 2006; Melchior et al., 2006). Manifestasi klinis dari infeksi oleh bakteri pembentuk biofilm adalah adanya resistensi terhadap pengobatan antibiotik. Terapi antibiotik pada umumnya hanya akan membunuh sel-sel bakteri *planktonic* (yang berenang-berenang di luar biofilm) sedang bentuk bakteri yang tersusun rapat dalam biofilm akan tetap hidup dan berkembang serta akan melepaskan bentuk sel-sel *planktonic* keluar dari formasi biofilm. Demikian juga

* Kesehatan Hewan Laboratorium PT Greenfields Indonesia

** Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

terhadap sistem kekebalan hospes di mana formasi biofilm mampu melindungi bakteri di dalamnya dari efektor-efektor sistem imun hospesnya (**Davey and O'toole**, 2000; **Melchior et al.**, 2006).

Telah diketahui bahwa bakteri yang mampu memproduksi biofilm berhubungan dengan penyakit infeksi yang kronis. Sejak awal tahun 1990-an telah dibuktikan bahwa bakteri yang menyebabkan penyakit pada manusia mampu membentuk biofilm seperti pada *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (penyebab infeksi nosokomial), *E. coli* (prostatitis bakterial, infeksi saluran empedu), *Streptococcus* spp. (caries gigi, periodontitis, endocarditis, meningitis, dan pneumonia). Bakteri-bakteri tersebut juga merupakan bakteri penyebab mastitis pada sapi perah (**Melchior et al.**, 2006). Demikian pula telah diketahui bahwa beberapa *streptococci* dari grup-mitis (*Streptococcus mutans* dan *Streptococcus pneumoniae*) mampu membentuk biofilm (**Varhimo et al.**, 2011). Penelitian lain menyebutkan bahwa hampir 65% infeksi mastitis oleh *S. aureus* berhubungan dengan produksi formasi biofilm (**Ymele-Leki and Ross**, 2007). Penelitian biofilm *S. uberis* belum banyak dilakukan, padahal sudah banyak dilakukan penelitian mengenai faktor virulensi bakteri ini yang sangat memungkinkan untuk mampu membentuk formasi biofilm. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis produksi slime, formasi biofilm dan keberadaan dari matrix ekstraseluler yang dikaitkan dengan produksi biofilm dari *S. uberis*.

MATERI DAN METODE

Isolat yang dipakai untuk penelitian adalah: isolat lapangan *S. uberis* yang berasal dari kasus mastitis kronis dan isolat standard *S. uberis* ATCC 9927. Untuk kontrol positif biofilm digunakan kultur standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Staphylococcus simulans* ATCC 27851 sedang untuk kontrol negatif biofilm digunakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228. Mastitis kronis didefinisikan menurut **Gonzalez et al.**, (1990) didefinisikan sebagai kejadian mastitis pada satu kuartal lebih dari satu kali dan disolasi bakteri yang sama atau tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada sampel kasus mastitis pada kejadian berikutnya.

Identifikasi Bakteri dan Uji Sensitivitas Antibiotik

Untuk kultur dan subkultur semua sampel yang digunakan *Todd-Hewitt Broth* (Oxoid, CM0189B), dengan ditambah *yeast extract* (Oxoid, LP0021B) 1% (THBY) dan *Blood Agar* (BA) yang terbuat dari *Tryptose blood agar* (Oxoid, CM0233B) dengan suplementasi darah sapi yang

telah dicuci dengan PBS tiga kali dan diambil eritrositnya sebesar 5%.

Identifikasi *S. Uberis* dilakukan menggunakan kit komersial APIstrep20 (Biomérieux). Uji sensitivitas dilakukan untuk menentukan kejadian kronis bukan karena terjadi resistensi terhadap antibiotik yang digunakan untuk terapi. Oleh karena itu uji sensitivitas antibiotik dilakukan terhadap antibiotik yang beredar di pasaran sebagai obat intramammary. Uji sensitivitas dilakukan dengan metode *modified Kirbie-Bauer* menurut **Wu** (1995).

Metode Mikrotiter Plate (MTP) Biofilm

Metode yang dipakai berdasarkan **Meritt et al.** (2005) dengan beberapa penyesuaian. Setiap sampel termasuk positif dan negatif kontrol diambil satu koloni dan diinokulasikan ke dalam 10 mL THBY. Kemudian diinkubasi di dalam shaker inkubator pada suhu 37° C selama satu malam untuk mencapai fase stasioner. Pada hari berikutnya dilakukan pengukuran absorbent dengan spektrofotometer untuk mengetahui jumlah bakteri, selanjutnya suspensi bakteri diencerkan sampai mencapai konsentrasi bakteri 10⁶ dengan media THBY.

Plat mikrotiter steril dengan flat bottom 96-well dinokulasi dengan kultur yang telah diencerkan sebanyak 200 µL dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam dilakukan pencucian dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak 4 kali untuk menghilangkan bakteri *planctonic* dan dikeringkan untuk selanjutnya dilakukan pewarnaan. Pewarnaan dengan larutan kristal violet (Merck, 1159400025) 0,1% sebanyak 200 µL dan diinkubasi di dalam temperatur ruangan selama 15 menit. Cairan sisa pewarnaan dicuci dengan aquabidest beberapa kali sampai tidak ada warna pada air bilasan, kemudian dikeringkan dan ditambahkan pelarut warna yaitu DMSO (Merck, 1029500500) 100% sebanyak 100 µL. Kemudian plate digoyang selama 1 menit untuk selanjutnya diletakkan dalam mikroplate reader untuk dibaca absorbant-nya pada panjang gelombang 567 nm. Setiap isolat dilakukan replikasi sebanyak 8 kali.

Penentuan Cut of Value (COV) dan Interpretasi Data

Penentuan COV dilakukan menurut **Atsan et al.** (2012) dan **Moore** (2009) media THBY steril diinokulasikan ke dalam mikrotiter plate steril seperti metode mikrotiter plate untuk kemudian diinkubasi bersama mikrotiter plate pembentukan biofilm. Selanjutnya dilakukan perlakuan yang sama seperti pemeriksaan pembentukan biofilm. Replikasi dilakukan sebanyak 8 kali untuk kemudian dihitung COV dengan rumus:

$$\text{COV} = \text{Rataan OD blank} + (3 \times \text{SD OD blank})$$

Interpretasi data dilakukan dengan melihat COV di mana strain dinyatakan negatif jika nilai optical density (OD) di bawah nilai COV-nya, positif lemah jika nilai OD di antara nilai COV dan dua kali nilai COV, dan positif jika nilai OD nya sama dengan atau lebih dari dua kali nilai COV. Untuk pemeriksaan SEM dipilih masing-masing satu isolat.

Pemeriksaan Scanning Electron Microscopy (SEM)

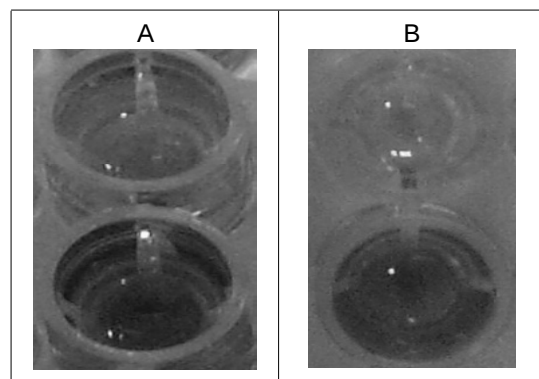
Pemeriksaan SEM dilakukan menurut metode **Atsan et al.**, (2012), dengan sedikit modifikasi. Bakteri *S. uberis* ditumbuhkan seperti pada metode mikrotiterplate kemudian diencerkan dengan THBY dan THBY plus casein sebesar 1: 100 di dalam media tersebut sebanyak kurang lebih 10 mL, selanjutnya suspensi bakteri dituang ke dalam cawan petri dengan diameter 5 cm yang telah diletakkan cover glass pada dasar cawan. Bakteri di dalam cawan petri diinkubasi untuk menumbuhkan biofilm selama 48 jam.

Cover glass yang telah ditumbuhi biofilm diambil untuk kemudian difiksasi dengan metanol 70% selama 20 menit pada suhu ruangan, cover glass dikeringkan semalaman pada suhu ruang. Cover glass di-coating dua kali dengan *platinum vanadium* menggunakan *ion sputter* (Bal-Tec SCD 005), setelah itu cover glass direkatkan pada *double-side carbon tape* untuk diperiksa menggunakan SEM (Hitachi TM3000).

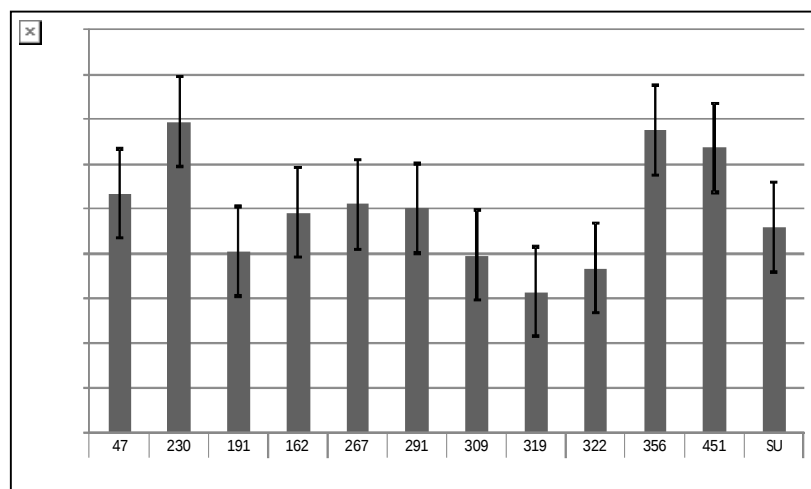
HASIL DAN DISKUSI

Pada uji MTP didapatkan OD (cut of value) COV sebesar 0,051. dari angka tersebut dapat disimpulkan

bahwa 13 isolat *S. uberis* dalam penelitian ini nilai OD-nya berada di atas nilai COV, sehingga bisa disimpulkan semua isolat *S. uberis* asal mastitis kronis pada sapi perah yang diuji dalam penelitian ini merupakan bakteri pembentuk biofilm. Dari 13 isolat tersebut didapatkan 9 (69%) isolat merupakan pembentuk biofilm lemah dan sisanya 4 (31%) isolat merupakan pembentuk biofilm kuat (*Gambar 2*). Hasil yang berbeda didapatkan oleh **Moore** (2009) dari 27 isolat yang diujikan 23 isolat merupakan pembentuk biofilm dengan 78% merupakan pembentuk biofilm kuat dan 7% merupakan pembentuk biofilm lemah. Uji MTP memberikan hasil kuantitatif untuk uji pembentukan biofilm. Bakteri yang melekat bisa diukur berdasarkan optical density (OD) pada well. Semakin banyak bakteri yang melekat pada well, maka akan semakin tinggi OD yang didapatkan (**Westgate et al.**, 2011).



Gambar 1. Pewarnaan biofilm dalam mikrotiter plate (A) *S. uberis* isolat pembentuk kuat pada bagian bawah dan lemah bagian atas, (B) kontrol positif bagian bawah dan negatif bagian atas.



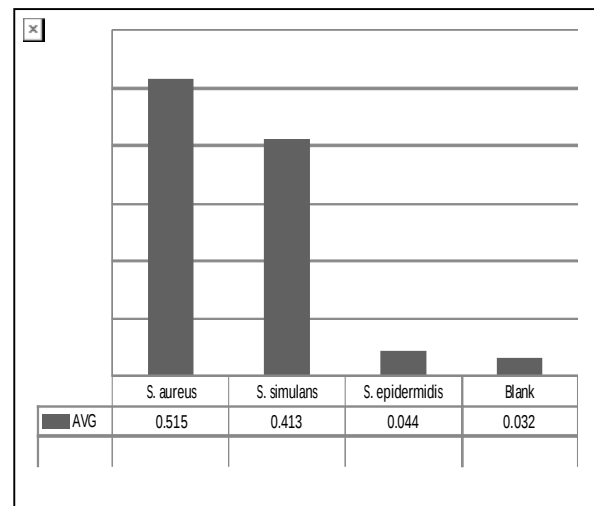
Gambar 2. Hasil Pemeriksaan Pembentukan Biofilm Metode MTP OD Tertinggi pada Isolat 230 dan Terendah pada Isolat 319, SU (*S. uberis* ATCC 9927).

Kekurangan dari metode ini adalah biofilm yang ditumbuhkan dilekatkan pada permukaan polysterene mikrotiter plate 96 well, di mana tidak semua bakteri mampu melekat pada permukaan polysterene. Crystal violet pewarna yang digunakan dalam metode ini juga mewarnai komponen lain selain sel bakteri sehingga pencucian crystal violet menjadi sangat penting dalam metode ini untuk menghindari *false positif* (**Merrit et al.**, 2005; **Westgate et al.**, 2011).

Untuk bakteri kontrol *S. aureus* ATCC 25923 dan *S. simulans* ATCC 27851 keduanya termasuk pembentuk kuat biofilm sedang *S. epidermidis* ATCC 12228 tidak mampu membentuk biofilm. Rataan *S. aureus* sebesar $0,515 \pm 0,071$ lebih tinggi dari *S. simulans* yang sebesar $0,413 \pm 0,038$, *S. epidermidis* hanya sebesar $0,044 \pm 0,015$ (**Gambar 3**).

Penggunaan *scanning electron microscopy* (SEM) dalam penelitian ini bertujuan untuk melihat matriks ekstraseluler polisakarida dan glikoprotein. Pada metode SEM fiksasi menjadi kunci terlihatnya obyek penelitian. Dengan fiksasi konvensional yaitu beberapa kali dehidrasi dengan melewati obyek dalam beberapa konsentrasi etanol atau formaldehid yang dilanjutkan critical-point drying membuat matriks biofilm rusak selama proses tersebut (**Johan et al.**, 2009). Metode baru dikembangkan dengan melakukan fiksasi pada spesimen dengan menggunakan metanol 70% yang kemudian dikeringkan dalam suhu ruang untuk selanjutnya dilakukan *coating* (**Atsan et al.**, 2012).

Penelitian ini menggunakan metode fiksasi tersebut dan hasilnya konsisten dengan yang didapat oleh **Atsan**

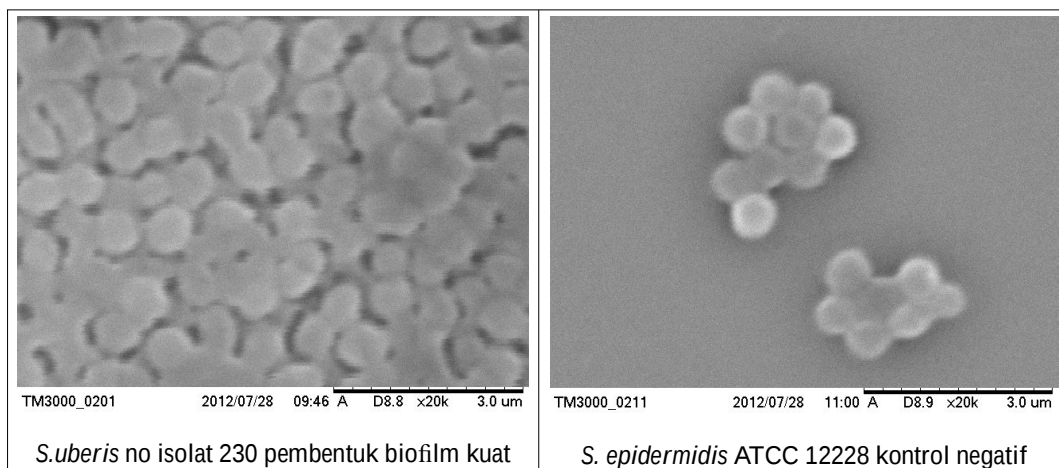


Gambar 3. Hasil Uji Pembentukan Biofilm dengan Metode MTP pada Isolat Bakteri Kontrol.

et al., (2012) maupun dengan hasil uji pembentukan biofilm lain dalam penelitian ini di mana dapat dilihat dalam adanya matriks ekstraseluler polisakarida pada bakteri yang membentuk biofilm (**Gambar 4**) tetapi tidak terlihat pada kontrol negatif yaitu *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

SIMPULAN

Pada penelitian ini *S. uberis* yang diisolasi dari kasus mastitis kronis mampu membentuk formasi biofilm pada permukaan abiotik *in Vitro*. Sebagian besar isolat (69%)



Gambar 4. Hasil Pemeriksaan SEM Terlihat Matriks Ekstraseluler Polisakarida (Panah) pada *S. uberis* (Kiri) dan Tidak Terlihat pada Kontrol Negatif *S. epidermidis* (Kanan).

merupakan pembentuk biofilm lemah sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan faktor-faktor apa yang menunjang pertumbuhan biofilm *S. uberis* sehingga bisa menyebabkan mastitis kronis pada sapi perah.

DAFTAR PUSTAKA

- Atshan SS, MN Shamsudin, LTT Lung, Z Sekawi, E Ghaznavi-Rad, and CP Pei**, 2012. Comparasion of Genotypically Different Clones of MRSA in the Production of Biofilm. J. of Biomed. And Biotech. Vol. 2012, Article ID 417247, 7 pages doi:10.1155/2012/417247.
- Davey ME, and G O'Toole**, 2000. Microbial Biofilm: from Ecology to Molecular Genetics. Mic and Mol. Reviews. 64(4): 847–867.
- Gonzalez RN, DE Jasper, NC Kronlund, TB Fayerr, JS Cullor, RB Bushnell, and JD Dellinger**, 1990. Clinical Mastitis in Two California Dairy Herds Participating n Contagious Mastitis Control Programs. J Dai. Sci. 73: 648–660.
- Johan V, H Martin, H Danie, and M Johan**, 2009. Antimicrobial coating agents: can biofilm formation on a breast implant be prevented? Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 62(5): 610–617.
- Khan MZ, and A Khan**, 2006. Basic fact of mastitis in dairy animal: A Review. Pakistan Vet J. 26(4): 204–208.
- Melchior, MB, H Vaarkamp and J Fink-Gremmels**, 2006. Biofilm: Arole in reurent mastitis infection ? The Vet. Journal 171: 398–407.
- Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA**, 2005. Growing and Analyzing Static Biofilms. Current Protocols in Microbiology 1B.1,1–1B.1,17.
- Moore, GE**, 2009. Biofilm production by *Streptococcus uberis* associated with intramammary infection (Thesis). University of Tennessee.
- Oliveira M, R Bexiga, SF Nunes, C Carneiro and LM Cavaco**, 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Mastitis Isolate. Vet. Mic. 116: 133–140.
- Varhimo E, P Varmanen, A Fallarero, M Skogman, S Pyörälä, A Livanainen, A Sukura, P Vuorela, and K Savijoki**, 2011. Alpha- and β -casein Component of Host Milk Induce Biofilm Formation in The Mastitis Bacterium *Streptococcus uberis*. Vet Mic 149: 381–389.
- Westgate SJ, SL Percival, PD Clegg, DC Knottenbelt and CA Cochrane**, 2011. vidence and significance of biofilm in chronic wounds in horses. dalam: Biofilm and Veterinary Medicine, Springer Series on Biofilm 6. p: 143–173.
- Ymele-Leki P, and JM Ross**, 2007. Erosion from *Staphylococcus aureus* Biofilm Grown under Physiologically Relevant Fluid Shear Forces Yields Bacterial Cells with Reduced Avidity to Collagen. App. Env. Mic. 73(6): 1834–1841.
- Wu, WG**, 1995. Medical Microbiology: A Laboratory Study. San Francisco State University California USA.