

METODE SEDERHANA DAN EFEKTIF UNTUK PENGHITUNGAN DAN VISUALISASI TIGA DIMENSI (3D) BIOFILM *VIBRIO CHOLERA*

A SIMPLE AND EFFECTIVE METHOD FOR CALCULATION AND 3D VISUALIZATION OF BIOFILM PRODUCED BY VIBRIO CHOLERA

Asep Awaludin Prihanto^{*1}, Sukoso¹, Mohamad Fadjar² dan Andi Kurniawan^{3,4}

¹Prog. Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Jl. Veteran, Malang, 65145, Telp (0341) 553512, Indonesia

²Prog. Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Jl. Veteran, Malang, 65145, Telp (0341) 553512, Indonesia

³Prog. Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Jl. Veteran, Malang, 65145, Telp (0341) 553512, Indonesia

⁴Pusat Studi Pesisir dan Kelautan, Universitas Brawijaya Jl. Veteran, Malang, 65145, Telp (0341) 553512, Indonesia

*Korespondensi penulis: asepa_awa@ub.ac.id

Submitted: 12-01-2015, Revised: 21-05-2015, Accepted: 16-06-2015

Abstrak

Mikroorganisme yang mampu menghasilkan biofilm menimbulkan masalah yang serius dalam bidang kesehatan dan pangan. Penelitian biofilm bagi sebagian peneliti sangat identik dengan kerumitan proses penghitungan dan visualisasi penutupan permukaan substrat penempelan bakteri. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui efisiensi metode alternatif untuk menghitung dan memvisualisasikan biofilm Vibrio cholera. Pada penelitian ini beberapa faktor lingkungan seperti pH, suhu, dan kondisi kultur diujicobakan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pembentukan biofilm V. cholera. Pembentukan biofilm dihitung berdasarkan Biofilm Coverage Rate (BCR) yang selanjutnya divisualisasikan menjadi bentuk tiga dimensi (3D) dengan memanfaatkan software Image-J. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH, suhu, dan kondisi kultur mampu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pembentukan biofilm Vibrio cholera. Metode alternatif yang digunakan dalam penelitian ini mampu menghitung BCR serta menggambarannya dalam bentuk 3D dengan efisien sehingga dapat dijadikan alternatif analisis biofilm bakteri.

Kata Kunci: image-J, biofilm, Vibrio cholera

Abstract

Microorganism which produces biofilm, will causes serious issues in health and safety of food. Researches in biofilm are identic with the complexities and relatively laborious tasks especially on assaying and visualizing-method of biofilm. This study was aimed to calculate and visualize biofilms produced by Vibrio cholera. In this study several environmental factors such as pH, temperature, and culture conditions have been tested to determine its influence on biofilm formation of Vibrio cholerae. Biofilm formations were calculated and visualized based on Biofilm coverage rate (BCR) and three dimensions (3D) structure using Image-J software. The results showed that pH, temperature, and culture conditions had a significant influence on the formation of V. cholerae biofilm. The alternative method that was used in this study could efficiently calculate and visualize BCR to 3D structures. Therefore, here we report an alternative method for calculating bacterial biofilm.

Keywords : image-J, biofilm, Vibrio cholera

Pendahuluan

Biofilm adalah sekumpulan mikroorganisme yang menempel pada suatu permukaan melalui perantara matrik eksopolisakarida. Bakteri patogen dalam bentuk biofilm, dapat mengakibatkan dampak yang serius pada bidang kesehatan dan pangan. Biofilm diketahui berhubungan dengan kejadian infeksi yang berhubungan dengan kateter dan penyakit *cystic fibrosis* serta ketahanan bakteri pada antibiotik.¹ Pada bidang pangan, biofilm yang terbentuk di peralatan industri pengolahan pangan meningkatkan risiko kontaminasi tidak langsung bahan pangan oleh mikroba.² Beberapa mikroorganisme patogen dan pembusuk seperti *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* dan *Vibrio cholera* ditemukan menempel dan membentuk biofilm pada peralatan kesehatan, dan industri pangan.^{3,4}

Sampai saat ini penelitian tentang biofilm pada kesehatan dan industri pangan masih terus dilakukan untuk meminimalisir proses terbentuknya biofilm. Penelitian biofilm bagi sebagian peneliti masih identik dengan kerumitan proses analisis yang meliputi penghitungan dan visualisasi penutupan permukaan substrat yang ditempel bakteri. Metode penghitungan dan penyajian biofilm dalam bentuk tiga dimensi (3D) menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM), *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) yang dilanjutkan dengan menganalisisnya dengan *software* berbayar adalah cara yang umum untuk pengujian biofilm.^{5,6} Metode tersebut menghasilkan visualisasi yang baik tetapi metode-metode tersebut tergolong mahal, membutuhkan proses preparasi sampel yang lama serta mempunyai kelemahan pada penetrasi sampel yang disebabkan karena sampel dalam kondisi kering sehingga dikhawatirkan dapat mengacaukan hasil analisis sebagai akibat dari penyusutan biofilm. *Image-J*, adalah *software* pemrosesan gambar yang dapat diunduh secara gratis dari "National Institute of Health", USA. *Software* ini dapat digunakan untuk menganalisis berbagai gambar yang berhubungan dengan gambar analisis di bidang biologi molekuler seperti *western blotting* dan *PCR band*. Pemanfaatan *Image-J* untuk biofilm, masih belum pernah dilaporkan.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efektifitas metode analisis alternatif yang diujicobakan untuk menghitung dan memvisualisasikan biofilm *V. cholera* yang dikultur pada lingkungan yang berbeda.

Metode

Bakteri uji *Vibrio cholera* El Tor diisolasi dari sedimen tambak udang semi intensif di Bangil Pasuruan.

Pembentukan biofilm dilakukan berdasarkan metode Gottenbos⁷ dan Adachi *et al*⁸ dengan beberapa modifikasi. Bakteri *V. cholera* El Tor dikultur dengan media *marine Luria Bertani* (mLB) pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 5 ml inokulum cair dimasukkan dalam *microtiter plates* tipe *oxidized polystyrene* (Iwaki, Japan) yang telah dimasuki *coverslip* berbentuk oval. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam sambil digoyang dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm (selain perlakuan kondisi kultur dinamik). Setiap 6 jam dilakukan penggantian media mLB baru.

Prosedur pengamatan efek pH dilakukan menggunakan metode Wulff *et al*⁹ yaitu media *Luria Bertani* (LB) dibuat dengan kisaran pH yang berbeda menggunakan 1 M HCl untuk pengaturan asam dan 1 M NaOH untuk pengaturan basa. pH yang diujicobakan berada pada kisaran pH 6, 6,5; 7; 7,5 dan pH 8.

Efek suhu dievaluasi dengan melakukan inkubasi kultur bakteri *V. cholera* El Tor dalam media *Luria Bertani* (mLB) pada suhu yang berbeda-beda. Inkubator diatur pada suhu 20, 25, 30°C dan inkubasi dilakukan selama 24 jam.

Kultur statik dilakukan dengan meletakkan *microtiter plate* yang telah diisi media mLB dan *V. cholera* El Tor kedalam inkubator tidak bergerak sedangkan untuk perlakuan kultur dinamis dilakukan dengan melakukan penggoyangan (*shaking*) pada kecepatan 100-150 rpm. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan pembentukan biofilmnya.

Pemanenan sampel dilakukan dengan membuang suspensi planktonik dan media kultur. *Microtiter plate* dicuci dengan air terdestilasi menggunakan pipet. Setiap sumuran dicuci sebanyak 3 kali untuk memastikan bakteri planktonik hilang sempurna dari *cover slip*. Selanjutnya dilakukan pengecatan bakteri mengikuti metode Pitt *et al*.¹⁰ Fiksasi dan pengecatan bakteri dilakukan dengan menggunakan 3% *crystal violet* selama 5-10 menit yang dilanjutkan dengan dicuci menggunakan etanol 99% sebanyak 2 kali.

Visualisasi dan penghitungan pembentukan biofilm dilakukan setelah pengecatan bakteri. *Cover slip* diamati di bawah mikroskop selanjutnya dilakukan pemotretan obyek. Pemotretan biofilm dilakukan dengan memilih

lima area secara acak. Hasil pemotretan dalam bentuk *full color* kemudian dirubah kedalam bentuk *grey schale images* dengan *software image-J*. Kuantifikasi BCR biofilm, ketebalan biofilm dan rasio volume biofilm diukur dengan menggunakan *software image-J* (*National Institutes of Health, USA*). Data disajikan dalam bentuk *surface plot*.

Hasil

Pengaruh pH terhadap BCR dan Visual 3D Biofilm

Penutupan biofilm (BCR) tertinggi didapatkan dari pH netral dengan jumlah *biofilm coverage rate* sebanyak 34,6% (Tabel 1.). Jumlah ini hampir limabelas kali lebih besar dibandingkan dengan penutupan permukaan pada kondisi kultur ber pH 6 yang merupakan perlakuan pH dengan hasil *biofilm coverage rate* terendah. Pada pH 7,5 hampir tidak terjadi perbedaan jumlah *biofilm coverage rate* jika dibandingkan dengan pH 6,5: dan pH 8. Hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri uji (*Vibrio cholera* El Tor) mempunyai kecenderungan lebih tahan dan lebih menyukai kondisi basa pada tingkat tertentu. Pada pH 8, *V. cholera* masih menunjukkan kemampuan untuk membentuk mikrokoloni seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

Pengaruh Suhu terhadap BCR dan Visual 3D Biofilm

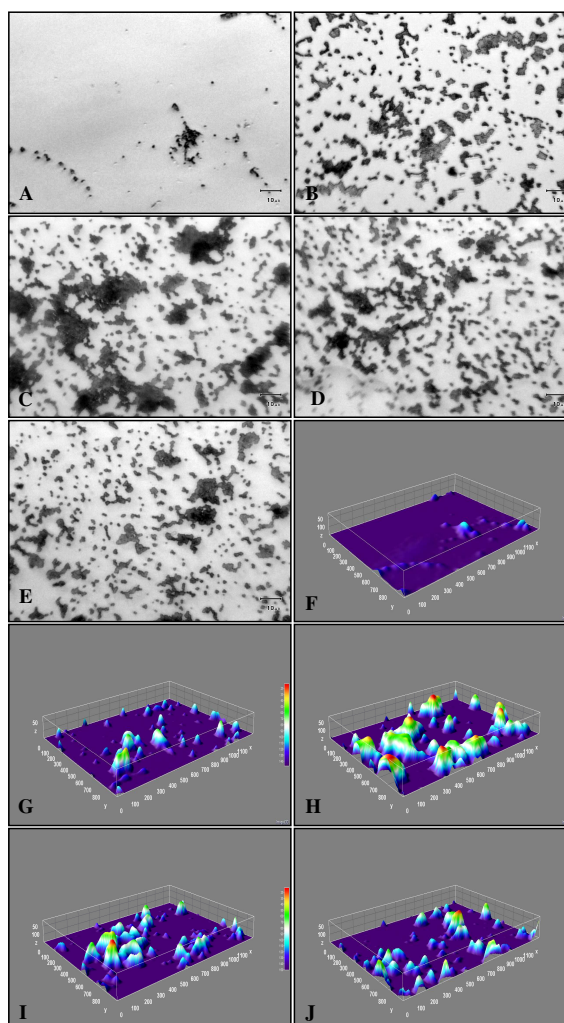
Kondisi optimal untuk pembentukan biofilm yang diindikasikan dengan penutupan permukaan substrat yang lebih besar sangat dipengaruhi oleh faktor suhu. Suhu 30°C menunjukkan hasil yang lebih tinggi angka *biofilm coverage rate* nya jika dibandingkan dengan suhu 20°C dan 25°C (Tabel 2 dan Gambar 2). Suhu 20°C menunjukkan angka BCR yang paling rendah. Hasil BCR meningkat mengikuti kenaikan suhu sampai 30°C.

Pengaruh Kondisi Kultur terhadap BCR dan Visual 3D Biofilm

Kondisi kultur penumbuhan biofilm terlihat bahwa perbedaan kondisi kultur mengakibatkan perbedaan pada biofilm yang terbentuk (Tabel 3 dan Gambar 3). Besaran *biofilm coverage rate* pada *V. cholera* yang ditumbuhkan dalam kondisi statik menunjukkan hasil delapan kali lebih besar dibandingkan dengan kultur dinamik.

Tabel 1. BCR pada pH yang Berbeda

pH	Total Koloni	Total Area	BCR %
6	88	25.299.000	2,1
6,5	269	276.003.000	22,5
7	228	424.940.000	34,6
7,5	295	331.085.000	26,9
8	376	286.689.000	23,3



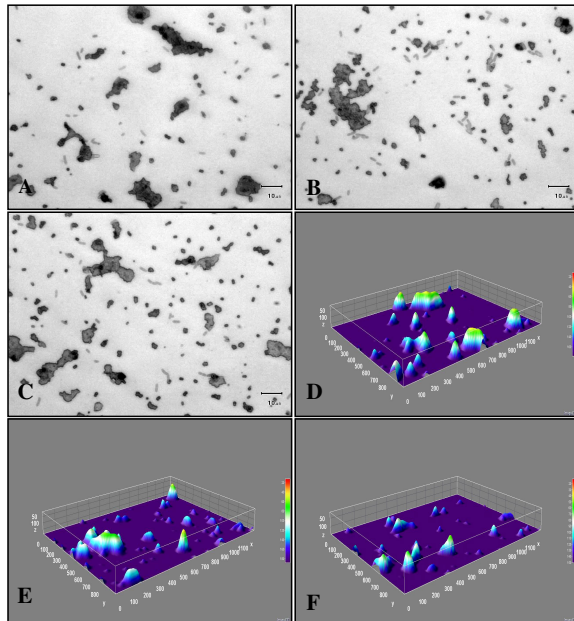
Gambar 1. Hasil Fase Kontras dan 3D Surface Plot Pengaruh pH terhadap Pembentukan Biofilm. A) Fase Kontras pH 6; B) Fase Kontras pH 6,5; C) Fase Kontras pH 7; D) Fase Kontras pH 7,5; E) Fase Kontras pH 8; dan F) 3D Surface Plot pH 6; G) 3D Surface Plot pH 6,5; H) 3D Surface Plot pH 7; I) 3D Surface Plot pH 7,5; J) 3D Surface Plot pH 8.

Pembahasan

Hasil pengujian kondisi lingkungan tumbuh mikroorganisme terhadap pembentukan biofilm menunjukkan bahwa keseluruhan faktor lingkungan yang diujikan mempunyai peran

Tabel 2. BCR pada Suhu yang Berbeda

Suhu	Total Koloni	Total Area	BCR (%)
20 °C	148	104.568.000	8,5
25 °C	240	114.140.000	9,3
30 °C	227	136.620.000	11,1



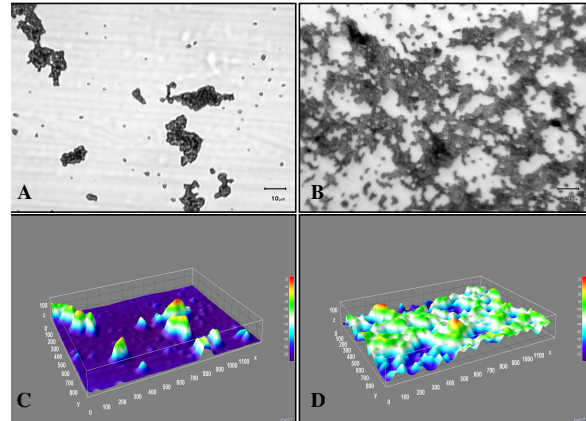
Gambar 2. Hasil Fase Kontras dan 3D Surface Plot Pengaruh Suhu terhadap Pembentukan Biofilm. A) Fase Kontras suhu 20°C; B) Fase Kontras Suhu 25°C; C) Fase Kontras Suhu 30°C; D) 3D Surface Plot Suhu 20°C; E) 3D Surface Plot Suhu 25°C; F) 3D Surface Plot suhu 30°C

yang sangat penting. Pembentukan biofilm yang paling optimal terjadi pada kondisi pH netral. pH media kultur mempunyai efek terhadap pertumbuhan bakteri dengan mempengaruhi ion dan mineral yang masuk kedalam sel. Proses transport beberapa mineral dan nutrisi sel bakteri dilakukan melalui proses transport aktif maupun pasif. pH mempengaruhi aktifitas transport sel melalui ketersediaan ion-ion hidrogen positif (H^+) dalam medium.¹¹ Kondisi optimal untuk pertumbuhan *V. cholera* secara umum adalah pada pH sekitar 7,6 dan masih toleran pada kisaran pH 5,0-9,6¹². Beberapa bakteri seperti *Salmonella enterica* juga mempunyai pembentukan biofilm yang optimum pada pH mendekati netral.¹³ Hasil ini mengindikasikan bahwa pH optimal untuk pertumbuhan mempunyai interaksi yang kuat dengan pH optimal untuk pembentukan biofilm.

Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh

Tabel 3. BCR pada Kondisi Kultur yang Berbeda

Kultur	Total Koloni	Total Area	BCR (%)
Dinamik	57	99.468.000	8,1
Statik	141	650.248.000	52,9



Gambar 3. Hasil Fase Kontras dan 3D Surface Plot Pengaruh Kondisi Kultur terhadap Pembentukan Biofilm. A) Fase Kontras Kultur Dinamik; B) Fase Kontras Kultur Statik; C) 3D Surface Plot Kultur Dinamik; D) 3D Surface Plot Kultur Statik.

perlakuan suhu inkubasi terhadap pembentukan biofilm. Pada suhu ruang sekitar 30°C *V. cholera* menghasilkan biofilm yang paling optimal. Hasil ini sesuai dengan penelitian Bonaventura *et al*¹⁴ yang menunjukkan bahwa beberapa bakteri menunjukkan kemampuan optimal membentuk bofilm pada suhu 32°C dibandingkan dengan suhu 37 dan 18°C. Hasil tersebut dikuatkan dengan penelitian Hostacka¹⁵ yang mengungkapkan bahwa *V. cholera* non-O1 dan *V. cholera* O1 menunjukkan pembentukan biofilm yang optimal pada suhu 30°C.

Pada kondisi dinamik, kultur dengan penggoyangan mengakibatkan bakteri semakin sulit untuk menempel. Kemampuan bakteri untuk dapat menempel pada permukaan substrat merupakan parameter penting dalam pembentukan biofilm. Permukaan *cover slip* yang terbuat dari kaca membuat permukaan lebih licin sehingga ketika mengalami penggoyangan akan menimbulkan eksopolisakarida yang dikeluarkan bakteri tidak dapat menempel dengan baik.¹⁶ Penelitian Coenye dan Nelis¹⁷ yang membandingkan beberapa metode pembiakan seperti *CDC biofilm reactor*, *drip flow reactor* kedua metode tersebut menunjukkan bahwa penurunan pembentukan biofilm akan terjadi pada kondisi kultur dinamik. Pada bakteri motil,

fimbria berperan penting dalam pembentukan awal biofilm. Pelekatan awal bakteri pada permukaan benda mati seperti gelas dan stainless steel dilakukan melalui pengkondisian permukaan dimana permukaan akan termodifikasi sedemikian rupa yang disebabkan oleh absorpsi beberapa komponen nutrisi yang bersentuhan dengan permukaan material. Komponen tersebut dapat berupa garam-garam anorganik, protein dan glikoprotein.¹⁸ Sehingga semakin licin suatu permukaan maka semakin kecil kemungkinan nutrisi menetap lama untuk bersentuhan dengan permukaan substrat sebagai akibat pergerakan saat dilakukan penggosokan.

Secara keseluruhan metode analisis alternatif yang digunakan dalam penelitian ini mampu menggambarkan kondisi pembentukan biofilm. Hasil analisis biofilm pada *V. cholera* yang dilakukan dengan memodifikasi lingkungan pertumbuhannya (pH, suhu, statik dan dinamik) mampu dianalisis dan dijelaskan melalui metode yang sangat mudah dan efisien. Hal ini juga didukung dengan kesesuaian temuan penelitian ini dengan rujukan yang telah lebih dulu dipublikasikan. Keberhasilan metode analisis dalam penelitian masih perlu dibandingkan dengan analisis yang telah jamak dilakukan yang melibatkan peralatan yang lebih canggih dan modern untuk lebih menguatkan dan mengetahui kemungkinan perbedaan hasil yang didapatkan. Metode analisis biofilm yang memanfaatkan *software* gratis dan hanya memanfaatkan peralatan mikroskop cahaya yang terintegrasi dengan kamera ternyata dapat digunakan dan diaplikasikan untuk menganalisis pembentukan biofilm.

Kesimpulan

Metode yang dikembangkan dalam penelitian ini memberikan alternatif pengujian biofilm dengan cara yang sederhana dan efektif. Penghitungan dan visualisasi *biofilm coverage rate V. cholera* dapat dilakukan dengan hanya menggunakan peralatan mikroskop cahaya yang terintegrasi dengan kamera serta *software Image-J*. Melalui metode alternatif tersebut, faktor lingkungan pH, suhu, dan kondisi kultur diketahui berpengaruh terhadap proses pembentukan biofilm *Vibrio cholera*.

Daftar Pustaka

1. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001, 7(2): 277-81.
2. Wirtanen G, Saarela M, Mattila-Sandholm T.

3. Kumar CG, Anand SK. A review: Significance of microbial biofilms in food industry. *Int J Food Microbiol*. 1998, 42(1): 9-27.
4. Møretrø T, Langsrud S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*. 2004, 1:107-21.
5. Kämper M, Vetterkind S, Berker R, Hoppert M. Methods for in situ detection and characterization of extracellular polymers in biofilms by electron microscopy. *J. Microbiol. Methods*. 2004, 57:55-64.
6. Singleton S, Treloar R, Warren P, Watson GK, Hodgson R, Allison C. Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. *Adv. Dent. Res*. 1997, 11:133-49.
7. Gottenbos B, Mei HCVD, Bussche HJ. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods Enzymol*. 1999, 310: 523-33
8. Adachi K, Tsurumoto T, Yonekura A, Nishimura S, Kahyama S, Hirakata Y, Shindo H. New quantitative image analysis of *Staphylococcus* biofilm on the surfaces of non-translucent metallic biomaterial. *J Orthop Sci*. 2007, 12: 178-84.
9. Wulff NA, Mariano AG, Gaurivaud P, Souza LCA, Virgilio ACD, Monteiro. Influence of Culture Medium pH on Growth, Aggregation, and Biofilm Formation of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol*. 2008, 57:127-32.
10. Pitts B, Hamilton MA, Zilver N, Steward PS. A Microtiter plate screening method for biofilm disinfectant and removal. *J Microbiol Method*. 2003, 54:269-76.
11. Hasman H, Bjerrum MJ, Christiansen LE, Hansen HCB, Aarestrup FM. The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *J Microbiol Methods*. 2009, 78:20-4.
12. Baron S. *Medical Microbiology*. 4th edition. Editor. Galveston (TX): University of Texas. USA. 1996.
13. Giaorius E, Chorianopoulos N, Nychas GJE. Effect of temperature, pH and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteridis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J food protect*. 2005, 68(10):2149-54.
14. Bonaventura GD, Stepanovic S, Picciani C, Pompilo A, Piccolomini RS. Effect of environmental factors on Biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia microbiol*. 2007, 52(1):86-90.
15. Hostacka A, Ciznara I, Stefkovicova. Temperature

- and pH Affect the Production of Bacterial Biofilm . *Folia Microbiol.* 2010, 55(1):75–8.
16. Hood SK, Zottola EA. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol.* 1997, 37:145–53.
 17. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2010, 83:89–105.
 18. Busscher HJ, Cowan MM, Van der Mei HC. Physico-Chemical Interactions In Initial Microbial Adhesion And Relevance For Biofilm Formation. *Adv Dent Res.* 1997, 2(1):24-32.