

Oxytetracycline Activities To *Staphylococcus aureus* Biofilm Inhibition Of Aceh Cattle Preputium Isolate

Maryulia Dewi¹, Darmawi², T. Zahrial Helmi³, Erina¹, Basri A.Gani⁴, Eliawardani⁵, Azhar⁶

^{1,2}Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

³Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

⁴Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

⁵Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

⁶Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

Email: maryuliad@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to see the antimicrobial activities of oxytetracycline to the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm of Aceh's cattle preputium isolates. The parameters measured in this study were the percentage of antimicrobial and biofilm inhibitory power. The antimicrobial activities were tested on Nutrient Broth using U-bottom polystyrene microplate 96 wells. The Biofilm stained using 1% of crystalviolet. Then, Optical Density (OD) read at λ 595 nm. The results showed that the oxytetracycline of 10%, 20% and 30% ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$) had the antimicrobial abilities of $28.60\% \pm 13.23\%$; $36.30\% \pm 5.37\%$; and $57.70\% \pm 2.23\%$. In addition, The biofilm inhibitory capacity of oxytetracycline 10%, 20% and 30% ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$) were $2.20\% \pm 8.77\%$; $2.70\% \pm 4.17\%$; and $3.73\% \pm 14.14\%$. Therefore, it can be concluded that the oxytetracycline had the ability to inhibit the biofilm of *Staphylococcus aureus*.

Key words: biofilm, *Staphylococcus aureus*, Aceh cattle preputium, oxytetracycline activity

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus merupakan bakteri yang mampu membentuk biofilm dan merupakan salah satu faktor virulensi yang menyebabkan infeksi dari bakteri ini sulit untuk disembuhkan (Das dan Kapoor, 2004). Pada penelitian Rahmi (2015) dan Khadafi (2012), *Staphylococcus aureus* positif diisolasi dari preputium dan vagina kuda (*equus caballus*) dan preputium kerbau lumpur (*swamp buffalo*). Menurut Karmakar *et al* (2016), Kacar dan Kaya (2014), *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri penyebab endometritis yang dapat menyebabkan subfertil dan infertilitas, sekalipun melalui inseminasi buatan (Zobel, *et al.*, 2013).

Produksi toksin ekstraseluler dan protein permukaan yang memfasilitasi kolonisasi jaringan, penghindaran dari sistem imunitas, dan kerusakan jaringan

pada *S. aureus* dikendalikan oleh gen regulator *Agr* dan *Sar a* yang mengkoordinasi ekspresi gen yang tepat untuk berbagai infeksi (Gordon dan Lowy, 2008). Pembentukan biofilm oleh *S. aureus* ditentukan oleh adanya gen *ica*, yang merupakan suatu gen operon yang terdiri dari *ica A*, *B*, *C* dan *D*, yang memproduksi polisakarida adhesin atau polisakarida interseluler adhesin (PIA) atau polimer N-asetil-glukosamin (PNAG) sehingga dianggap sebagai dasar terbentuknya biofilm (O'Neil, *et al.*, 2009).

Proses pembentukan biofilm diawali oleh penempelan sel-sel bakteri pada permukaan bahan yang bersifat sementara, sel-sel bakteri kemudian membentuk material eksopolimer yang merupakan suatu senyawa perekat yang lebih kuat sehingga menempel secara permanen membentuk mikrokoloni dan mulai membentuk biofilm. Biofilm yang terbentuk semakin banyak dan

membentuk struktur tiga dimensi yang mengandung sel-sel terselubung dalam beberapa kelompok yang saling terhubung satu sama lainnya. Perkembangan struktur biofilm mengakibatkan terjadinya dispersi sel sehingga sel-sel tersebut berpindah dan membentuk biofilm yang baru. Sensor kuorum digunakan sel-sel bakteri untuk berkolaborasi satu sama lainnya sehingga bermanfaat bagi keseluruhan populasi mikroorganisme pembentuk biofilm (Parsek and Singh, 2003).

Matriks Biofilm yang tersusun atas protein atau substansi polimerik ekstraseluler dipengaruhi oleh proses internal dan eksternal, dan biofilm yang telah terbentuk dapat menyebabkan resistensi antibiotik (Homonta, 2016). Gagalnya terapi antibiotik karena biofilm disebabkan oleh terhambatnya penetrasi antibiotik, bakteri ada dalam keadaan pertumbuhan yang lambat (*slow growth*) dan adanya ekspresi gen-gen resisten. Pembentukan biofilm ini juga dapat menyebabkan bakteri terlindungi dalam suatu matriks polisakarida sehingga tidak dapat dicapai oleh sistem imun hospes (fagositosis).

Hal di atas, melatarbelakangi penelitian untuk mengetahui aktivitas antibiotik Oksitetrasiklin terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi aceh. Kemampuan kuantitas pembentukan biofilm oleh *S. aureus* dihitung berdasarkan nilai OD (*optical density*) dengan menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595_{nm} (Bjarnsholt *et al*, 2011). Aktifitas antibiotik dihitung dengan menggunakan rumus modifikasi Persentase penghambatan biofilm (Nikolic *et al*, 2014):

MATERI DAN METODE

Materi

Penelitian ini menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi aceh. Prosedur isolasi dan indentifikasi bakteri mengikuti *Bergey's Manual Determination* (1994). Bakteri dibiakkan dalam media Nutrient Broth dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian bakteri diisolasi ke media Manitol Salt Agar dan diinkubasi kembali dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh dilakukan pengamatan morfologi koloni, pewarnaan Gram, uji katalase, uji fermentasi karbohidrat dan uji hemolisa.

Metode

Uji Daya Antimikroba oksitetrasiklin

Uji dilakukan dengan metode mikrodilusi pada microtiterplate U-bottom polystyrene 96 wells. Pengujian dilakukan terhadap antibiotik oksitetrasiklin dengan konsentrasi masing-masing 10%, 20% dan 30% ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dalam media NB (Nutrient Broth) dan suspensi bakteri dengan volume total 200 μL tiap well. Sebelumnya *S. aureus* dikultur dalam Nutrien Broth (NB) dan dihitung kuantitas berdasarkan nilai OD (*optical density*). Suspensi bakteri *S. aureus* yang digunakan setara standar McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) yaitu sebanyak 10 % v/v dari total suspensi uji. Suspensi uji kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan waktu 48 sampai 72 jam. Pembacaan nilai OD (*optical density*) dilakukan menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595_{nm} (Ardani, *at al.*, 2010) di laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan, Unsyiah. Pengujian dilakukan secara triplo sebanyak tiga kali ulangan.

Uji Penghambatan Biofilm

Uji biofilm dilakukan dengan teknik *crystal violet binding assay* (Bjarnsholt *et al*, 2011), untuk menilai kemampuan

pembentukan biofilm oleh *S. aureus*. Suspensi bakteri *S.aureus* yang digunakan setara standar McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) yaitu sebanyak 10 % v/v dari total suspensi uji. Pengujian dilakukan terhadap antibiotik oksitetrasiklin dengan konsentrasi 10%, 20% dan 30% ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dalam media NB dan suspensi bakteri dengan volume total 200 μL tiap well, dan suspensi bakteri saja sebagai kontrol negatif. Suspensi uji dan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam mikroplat, mikroplat ditutup dan diinkubasi pada 37°C dengan waktu 48 sampai 72 jam. Setelah diinkubasi, isi mikroplat dikeluarkan dan dicuci dengan PBS. Mikroplat diberikan pewarna dengan cara dimasukkan 200 μL larutan kristal violet 1% dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah mikroplat kering, sebanyak 200 μL etanol 96% dimasukkan ke dalam mikroplat dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Mikroplat diukur menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595_{nm} (Bjarnsholt *et al*, 2011). Pengujian dilakukan secara triplo sebanyak tiga kali ulangan. Persentase penghambatan biofilm dihitung menggunakan rumus modifikasi berikut (Nikolic *et al*, 2014):

$$\% \text{ Penghambatan Biofilm} = \left\{ 1 - \frac{(\text{OD Kontrol Negatif} - \text{OD Sampel Uji})}{\text{OD Kontrol Negatif}} \right\} \times 100\%$$

OD kontrol negatif = nilai OD bakteri tanpa antibiotik

OD sampel uji = nilai OD setelah perlakuan dengan antibiotik.

Analisis Data

Data kuantitatif dari parameter yang diukur dianalisis menggunakan pola *one way analysis of varian* (ANOVA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibiotik oksitetrasiklin mempunyai aktivitas tertinggi pada konsentrasi 30%, yaitu persen daya antimikroba terhadap *S. aureus* sebesar $57,70\% \pm 2,23\%$ dan penghambatan biofilm yang dibentuk oleh *S. aureus* sebesar $3,73\% \pm 14,14\%$. Hasil pengamatan tersebut disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Aktifitas Oksitetrasiklin terhadap daya antimikroba

dan penghambatan biofilm *S. aureus* Aktivitas oksitetrasiklin sebagai antimikroba dan antibiofilm *S. aureus* isolat preputium sapi aceh menunjukkan persentase yang rendah. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan oksitetrasiklin pada terapi pengobatan infeksi akibat *S. aureus* bersifat sementara. Hal ini didukung oleh penelitian Prawesthirini (2012), yang menyatakan bahwa tidak semua *S. aureus* yang diisolasi dari sapi perah di Probolinggo sensitif terhadap oksitetrasiklin.

Pengukuran nilai OD (*optical density*) dari daya antimikroba oksitetrasiklin dengan berbagai konsentrasi dapat dilihat pada gambar 1.

Gambar 1. Grafik hasil pengukuran nilai OD (*optical density*) daya antimikroba oksitetrasiklin terhadap *S. Aureus*

Aktivitas daya antimikroba oksitetrasiklin pada konsentrasi 10%, 20% dan 30% dari nilai OD yang diperoleh menunjukkan hasil yang meningkat. Namun dari hasil perhitungan, dapat dikatakan bahwa oksitetrasiklin belum efektif dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* yaitu sekitar 28,60 % - 57,70 %. Walaupun apabila dilihat dari sifat antibiotik, oksitetrasiklin adalah turunan dari Tetrasiklin yang merupakan antibiotik spektrum luas baik terhadap bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif (Zhang, 2007). Hal ini disebabkan karena oksitetrasiklin termasuk jenis antibiotik yang hanya dapat menghambat pertumbuhan kuman (bakteriostatik). Oksitetrasiklin

bekerja pada ribosom bakteri dengan cara menghambat sintesis bakteri pada ribosom 30s kodon-antikodon antara mRNA dengan tRNA (Sader, *et al.*, 2009).

Adapun nilai OD (*optical density*) dari penghambatan biofilm *S. aureus* oleh antibiotik oksitetrasiklin dapat dilihat pada gambar 2.

Gambar 2. Grafik hasil pengukuran nilai OD (*optical density*) penghambatan biofilm *S. aureus* oleh oksitetrasiklin

Aktivitas penghambatan biofilm *S. aureus* oleh antibiotik oksitetrasiklin terlihat signifikan, semakin tinggi konsentrasi antibiotik semakin tinggi pula penghambatan biofilm yang dihasilkan. Namun secara keseluruhan, dari hasil perhitungan kemampuan penghambatan biofilm *S. aureus* oleh oksitetrasiklin masih sangat rendah yaitu sekitar 2,20 % - 3,73 %. Hal ini disebabkan oleh sel-sel bakteri yang membentuk biofilm semakin banyak, sehingga perkembangan struktur biofilm mengakibatkan terjadinya dispersi sel sehingga sel-sel tersebut berpindah dan membentuk biofilm yang baru. Biofilm yang terbentuk menyebabkan terhambatnya penetrasi antibiotik oksitetrasiklin ke dalam sel bakteri (Sarah, *at al.*, 2017).

Hubungan aktivitas daya antimikroba oksitetrasiklin terhadap penghambatan biofilm *S. aureus* adalah semakin tinggi daya antimikroba oksitetrasiklin semakin tinggi pula persentase penghambatan biofilm. Hal ini dapat dilihat pada gambar 3.

Gambar 3. Grafik hubungan antara daya antimikroba dan daya penghambatan biofilm *S. aureus* oleh oksitetrasiklin

Aktivitas antibiotik oksitetrasiklin terhadap penghambatan biofilm oleh *S. aureus* yang paling tinggi adalah oksitetrasiklin 30% yang mempunyai aktivitas yaitu, daya antimikroba sebesar 57,70% \pm 2,23% dan persentase penghambatan biofilm sebesar 3,73% \pm 14,14%. Aktivitas Oksitetrasiklin yang

mempunyai daya antimikroba 57,70% hanya mampu menghambat pembentukan biofilm sebesar 3,73%. Hasil ini menunjukkan bahwa, walaupun oksitetrasiklin merupakan antibiotik spektrum luas, namun kemampuan menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* sangat rendah. Hal ini disebabkan karena bakteri dalam bentuk biofilm lebih resisten terhadap antibiotik 10-1000 kali dari pada tidak dalam biofilm (Madigan *et al.*, 2006). Namun demikian menurut Sarah, *at al.*, 2017, pengobatan antibiotik pada infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* lebih dipengaruhi oleh biofilm yang dibentuk oleh bakteri multispecies.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibiotik oksitetrasiklin terhadap biofilm *S. aureus* adalah semakin tinggi konsentrasi antibiotik, semakin tinggi pula persentase daya antimikroba dan persentase penghambatan biofilm. Oksitetrasiklin dapat berfungsi sebagai anti biofilm, hanya saja kemampuannya dalam menghambat pembentukan biofilm sangat rendah. Oksitetrasiklin mempunyai aktivitas paling tinggi pada konsentrasi 30%, yaitu daya antimikroba sebesar 57,70% \pm 2,23% dan kemampuan menghambat biofilm sebesar 3,73% \pm 14,14%.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Syiah Kuala, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas bantuan pendanaan kegiatan melalui skim Penelitian Pranata Laboratorium Pendidikan Tahun Anggaran 2017 Nomor: 1447/UN11/SP/PNBP/2017 tanggal 18 Mei 2017.

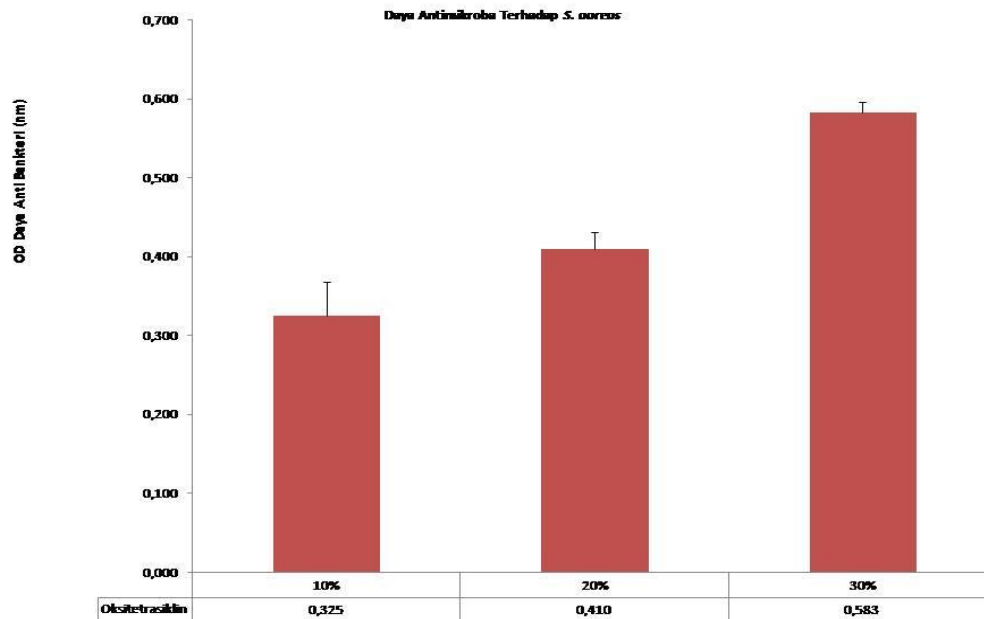
DAFTAR PUSTAKA

- Ardani, M., Sylvia, U.T.P., Triana, H. 2010. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. **J Farmasi Indonesia**, 21(3): 191–201.
- Bjarsholt, Th., Jensen, P.O., Moser, C., Hoiby, N. 2011. **Biofilm Infections**. Springer-Verlag, New York.
- Das, S.C. and K.N. Kapoor. 2004. Effect of growth medium on hydrophobicity of *Staphylococcus epidermidis*. **Indian J. Med. Res.** (119): 107 – 109.
- Gordon, R.J, and Lowy, F.D. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **J Clinical Infectious Diseases** (46):50-59.
- Homenta, H. 2016. Infeksi biofilm bakterial. **Jurnal e-Biomedik** 1 (4): 1-11
- Kacar, C., Kaya, S., 2014. Uterine infection in cows and effect of reproductive performance. Kafkas Univ. **J Vet Fak Derg** 20 (6) : 975-982.
- Karmakar, A., Dua, P., Ghosh, C. 2016. Biochemical and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Hospitalized Patients. Hindawi Publishing Corporation. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**. 2016: 1-7.
- Khadafi, M. 2012. Identifikasi *S. aureus* pada Preputium Kerbau Lumpur (Swamp buffalo) di Aceh Barat Daya. **Skripsi**. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh.
- Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. 2006. **Brock Biology of Microorganisms**. 11th Ed. Pearson Prentice Hall. New Jersey.
- Nicolic, M., Vasic, S., Durdevic, J., Stevanovic, O., Comic, L. 2014. *Antibacterial and Anti-biofilm Activity of Ginger (Zingiber officinate (Roscoe)) Ethanolic Extract*. Laboratory of Microbiology, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac. Kragujevac **J. Sci.** (36) 129-136.
- O'Neill, E., Humphreys, H., O'Gara, J.P. 2009. Carriage of both the *fnbA* and *fnbB* genes and growth at 37 degrees C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **J Med Microbiol.** 58 (4): 399-402.
- Parsek, M.R., Singh, P.K. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **J Annu. Rev. Microbiol.** (57): 677-701.
- Prawesthirini, S., Ferianto, A., Supranianondo, K. 2012. Pola Resistensi *Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Mastitis pada Sapi Perah di Wilayah Kerja KUD Argopuro Krucil Probolinggo terhadap Antibiotika. **Jurnal Veterinaria Medika** 5 (3): 181-186.
- Sader, H.S., Fey, P.D., Fish, D.N., Limaye, A.P., Pankey, G., Rahal, J., Rybak, M.J., Snyderman, D.R., Steed, L.L., Waites, K., Jones, R.N. 2009. Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. **J Antimicrob Agents Chemother.** 53(10): 4127-32.
- Sarah, T., Aurélie, C., Mayram, H., Liesbeth, S., Silke, H., Petra, R., Inne, D., Tom, C. 2017. Community Composition Determines Activity of Antibiotics against Multispecies Biofilms. **J Antimicrob Agents Chemother.** 61(9): e00302-17.
- Rahmi, Y., Darmawi, Mahdi, A., Faisal, J., Fakhurrizi, dan Yudha, F. 2015. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Preputium dan Vagina Kuda (*equus caballus*). **Jurnal Medika Veterinaria** (9): 154-158.
- Zhang, Y. 2007. **Mechanisms of Antibiotic Resistance in the Microbial World**. Baltimore, USA.
- Zobel, R., S. Tkalcic. 2013. Efficacy of Ozone and other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows. **J Reproduction in Domestic Animals.** (48): 121-125.

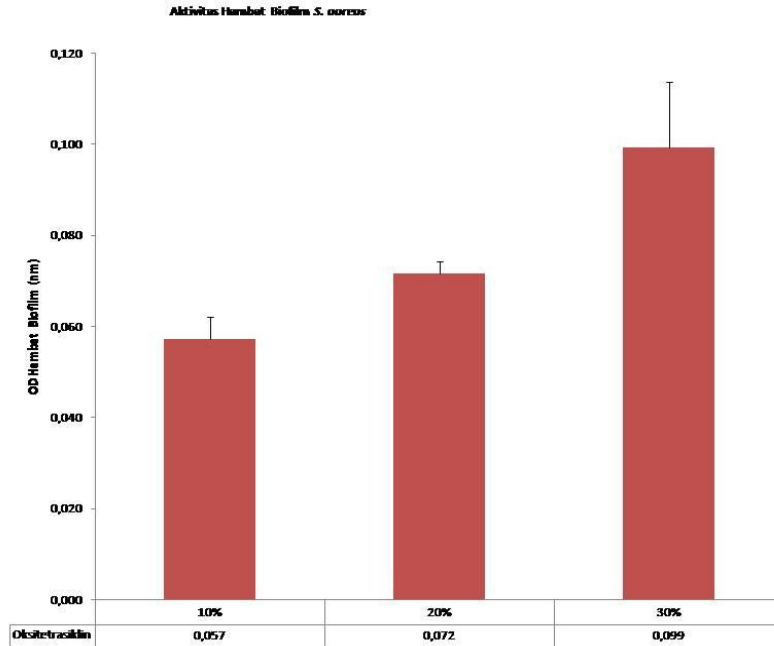
LAMPIRAN

Tabel 1. Aktifitas Oksitetrasiklin terhadap daya antimikroba dan penghambatan biofilm *S. aureus*

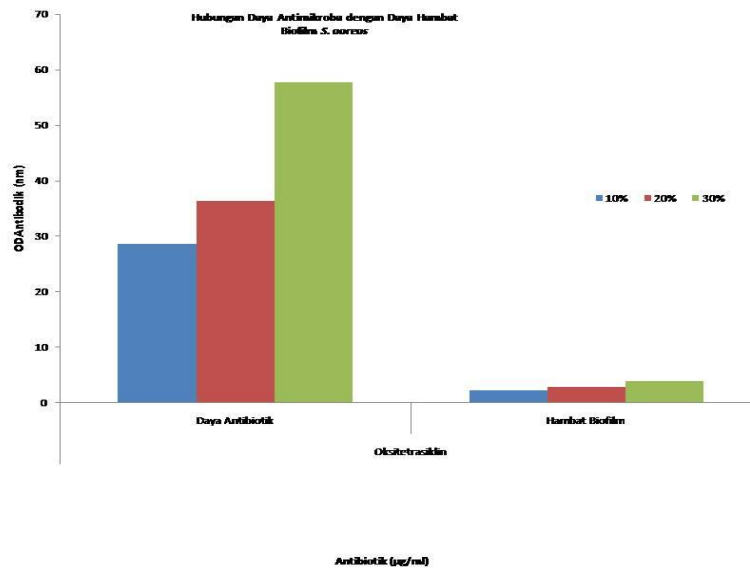
Antibiotik	Konsentrasi (mg/mL)	% Daya Antimikroba ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	% Penghambatan Biofilm ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Oksitetrasiklin	10	28,60 ± 13,23	2,20 ± 8,77
	20	36,30 ± 5,37	2,70 ± 4,17
	30	57,70 ± 2,23	3,73 ± 14,14



Gambar 1. Grafik hasil pengukuran nilai OD (*optical density*) daya antimikroba Oksitetrasiklin terhadap *S. aureus*



Gambar 2. Grafik hasil pengukuran nilai OD (*optical density*) aktivitas penghambatan biofilm *S. aureus* oleh Oksitetraxiklin



Gambar 3. Grafik hubungan antara daya antimikroba dan daya penghambatan biofilm *S. aureus* oleh Oksitetraxiklin