

# Penggunaan *Software Image-J* untuk Penghitungan dan Visualisasi 3D Tutupan Biofilm *Vibrio Cholerae* El Tor pada Kondisi Tumbuh Berbeda

Asep Awaludin Prihanto

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya  
Jl. Veteran, Malang, 65145, Email: asep\_awa@ub.ac.id

## Abstrak

Biofilm adalah sekumpulan mikroorganisme yang menempel dalam suatu permukaan dengan perantara matrik eksopolisakarida. Mikroorganisme dalam bentuk biofilm ternyata menjadi sumber kontaminasi sekunder di dalam produk pangan. Kenyataan ini menjadi latar belakang utama bagi peneliti mikrobiologi pangan untuk mempelajari biofilm. Penelitian biofilm bagi sebagian peneliti sangat identik dengan kerumitan proses penghitungan dan visualisasi penutupan permukaan substrat penempelan bakteri. Penelitian ini ditujukan untuk menghitung dan memvisualisasikan biofilm dengan cara sederhana dan mudah melalui *software image-J*. Pada penelitian ini beberapa faktor lingkungan seperti pH, suhu, dan kondisi kultur telah diujicobakan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pembentukan biofilm *Vibrio Cholerae* El Tor. Pembentukan biofilm dihitung berdasarkan angka tutupan (Biofilm Coverage Rate) yang kemudian divisualisasikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH, suhu, salinitas dan kondisi kultur mampu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pembentukan biofilm *Vibrio Cholerae* El Tor. *Image-J* mampu menghitung dan menggambarkan angka tutupan dengan baik dan dapat dijadikan alternatif *software* analisis biofilm bakteri.

**Kata kunci:** *image-J*, biofilm, *Vibrio Cholera* El Tor

## Abstract

Biofilms are microorganisms that attached to a surface with eksopolisakarida matrix. Microorganisms in a biofilm was known to be a secondary source of contamination in food products. This fact trigger many scientist and food microbiologist conducting research biofilms. Research in biofilm for many researchers are identical with the complexity of the assaying and visualizing surface-covered area of biofilm.. This study was aimed to calculate and visualize biofilms in a simple and easy way through *software image-J*. 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* El Tor. Biofilm formation was calculated based on Biofilm Coverage Rate (BCR) and then was visualized. The results showed that pH, temperature, salinity and culture conditions had a significant influence on the formation of *Vibrio Cholerae* El Tor biofilm. This result illustrated that *Image-J* can be able to calculate and to precisely describe the BCR visualization, therefore it can be used as alternatives *software* for bacterial biofilms analysis.

**Key words:** *image-J*, biofilm, *Vibrio Cholera* El Tor

## Pendahuluan

Munculnya bakteri patogen dalam bentuk biofilm pada produk dan peralatan industri pangan meningkatkan risiko keamanan pangan. Perhatian utama terhadap biofilm di dalam industri pangan adalah kerusakan yang disebabkan oleh pembentukan biofilm pada permukaan berbagai peralatan industri dan kontaminasi bahan pangan oleh mikroba biofilm [1]. Biofilm adalah sekumpulan mikroorganisme yang menempel dalam suatu permukaan dengan perantara matrik eksopolisakarida. Biofilm merupakan proses alami bakteri sebagai respon lingkungan sekitarnya. Salah satu konsekuensi terbentuknya biofilm ini adalah meningkatnya konsentrasi penggunaan

desinfektan yang selain berakibat munculnya residu juga meningkatkan biaya operasi perusahaan akibat dari meningkatnya kebutuhan desinfektan.

Beberapa mikroorganisme patogen dan pembusuk seperti *Listeria Monocytogenes* dan *Vibrio Cholerae* ditemukan menempel dan membentuk biofilm pada *conveyors belt*, *hand truck*, bak penyimpanan dan lantai pengeringan [2; 3]. Mikroorganisme ini ternyata menjadi sumber kontaminasi sekunder di dalam produk pangan [4]. Bakteri ini seringkali menggunakan mekanisme komunikasi sel (*quorum sensing*) untuk melakukan proses pembentukan biofilm. Penelitian penghambatan Biofilm *V. Cholerae* El Tor yang dilakukan Prihanto [5] menunjukkan bahwa biofilm mampu dihambat dengan merekayasa proses

komunikasi sel dan kondisi lingkungan pertumbuhan biofilm. Sampai saat ini penelitian tentang biofilm pada industri pangan masih terus dilakukan untuk meminimalisir dan menghilangkan biofilm bakteri yang terlanjur terbentuk pada peralatan produksi.

Penelitian biofilm bagi sebagian peneliti sangat identik dengan kerumitan proses penghitungan dan visualisasi penutupan permukaan substrat penempelan bakteri. Kebanyakan metode penghitungan dan visualisasi biofilm membutuhkan harga dan waktu yang tidak efisien. Penyajian biofilm dalam bentuk tiga dimensi (3D) menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM), *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) [6–8] meskipun mampu menghasilkan visualisasi yang baik tetapi metode tersebut tergolong mahal dan mempunyai kelemahan pada penetrasi sampel dan keharusan sampel dalam keadaan kering yang dikhawatirkan dapat mengacaukan hasil analisis yang disebabkan penyusutan biofilm karena lamanya preparasi sampel.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui angka tutupan biofilm pada kondisi kultur dan lingkungan yang berbeda dengan menggunakan metode analisis visualisasi dan kuantifikasi biofilm yang efisien dan cepat.

## Metode Penelitian

### Strain Bakteri

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

### Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm dilakukan berdasarkan metode Gottenbos, [9]; Adachi *et al.*, [10] dengan beberapa modifikasi. Bakteri *V. Cholerae* El Tor di kultur dengan media *marine Luria Bertani* (mLB) pada suhu 30–35° C selama 48 jam. Selanjutnya diambil sebanyak 5 ml dan dimasukkan dalam *microtiter plates* tipe *oxidized polystyrene* (Iwaki, Japan) yang telah dimasuki *cover slip*. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 30° C 24 jam sambil digoyang dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm (selain perlakuan kondisi kultur dinamis). Setiap 6 jam dilakukan penggantian media mLB baru.

### Efek pH

Prosedur pengamatan efek pH dilakukan menggunakan metode Wulff *et al.*, [11] yaitu media *Luria Bertani* (LB) dibuat dengan kisaran pH yang berbeda menggunakan HCl untuk pengaturan asam dan NaOH untuk pengaturan basa. pH yang diujicobakan adalah *range* pH 6, 6,5; 7; 7,5; dan 8.

### Efek Suhu

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

### Efek Kondisi Kultur Statis dan Dinamis

Kultur statis dilakukan dengan meletakkan *microtiter plate* yang telah diisi media mLB dan *V. Cholerae* El Tor ke dalam inkubator tidak bergerak sedangkan untuk perlakuan kultur dinamis dilakukan dengan melakukan *shaking* pada kecepatan 100–150 rpm. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan pembentukan biofilmnya.

### Pemanenan dan Pengecatan Biofilm

Pemanenan sampel dilakukan dengan membuang suspensi planktonik dan media dalam *microtiter plate*. *Microtiter plate* dicuci dengan aquades 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.*, [12]. Fiksasi dan pengecatan bakteri dilakukan dengan menggunakan 3% *crystal violet* selama 5–10 menit setelah itu dicuci dengan menggunakan etanol 99%.

### Pemrosesan gambar untuk penghitungan dan visualisasi biofilm

Uji pengaruh pembentukan biofilm dilakukan dengan menghitung tutupan biofilm atau *Biofilm Coverage Rates* (BCR) didasarkan pada metode [10; 12]. Visualisasi dan penghitungan pembentukan biofilm dilakukan setelah pengecatan bakteri. *Cover slip* diamati di bawah mikroskop dan dilakukan pemotretan obyek. Pemotretan biofilm dilakukan dengan memilih

lima area secara *full color*. Pada eksperimen ini diambil sebanyak lima foto. Foto *full color* kemudian diubah (*convert*) ke dalam *grey scale images* dengan *software image J*. Kuantifikasi biofilm BCR, ketebalan biofilm dan rasio volume biofilm diukur dengan menggunakan *software image J* (*National Institutes of Health, USA*). Data disajikan dalam bentuk *surface plot*.

## Hasil dan Pembahasan

### Pengaruh pH terhadap BCR dan Visual 3D Biofilm

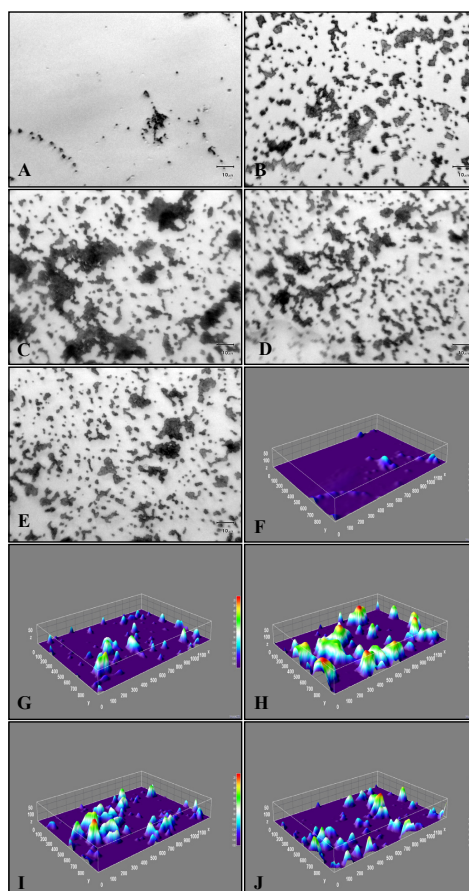
Penutupan biofilm/BCR tertinggi didapatkan dari pH netral dengan jumlah tutupan 34,6 % (Tabel 1). Jumlah ini hampir lima belas kali lebih besar dibandingkan dengan penutupan permukaan pada kondisi kultur ber-pH 6 yang merupakan perlakuan pH dengan hasil tutupan biofilm terendah. Pada pH 7,5 hampir tidak terjadi perbedaan jumlah tutupan biofilm yang signifikan jika dibandingkan dengan pH 6,5; 7,5 dan pH 8. Hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri uji (*Vibrio Cholera El Tor*) mempunyai

kecenderungan lebih tahan dan lebih menyukai kondisi basa pada jumlah tertentu. Paling tidak pada pH 8 masih menunjukkan kemampuan untuk membentuk mikro koloni seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

**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

pH media mempunyai efek terhadap pertumbuhan bakteri dengan mempengaruhi mekanisme beberapa ion dan mineral yang masuk ke dalam sel. Proses *transport* beberapa mineral dan nutrisi bagi sel bakteri dilakukan melalui proses *transport* aktif maupun pasif,



**Gambar 1.** 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.

hal ini terutama terjadi pada mekanisme *transport* aktif. Oleh karena itu pH mampu mempengaruhi aktivitas *transport* ini melalui ketersediaan ion-ion  $H^+$  dalam medium [13]. Selain itu kondisi optimal untuk pertumbuhan *V. Cholerae* secara umum adalah pada pH sekitar 7,6 dan masih memungkinkan untuk hidup pada pH 5,0-9,6 [14]. Beberapa bakteri seperti *Salmonella Enterica* juga mempunyai pembentukan biofilm yang optimum pada pH mendekati netral [15].

### Pengaruh Suhu terhadap BCR dan Visual 3D Biofilm

Suhu yang paling optimal untuk pembentukan biofilm ditunjukkan dengan penutupan permukaan substrat yang lebih besar. Suhu  $30^{\circ}C$  menunjukkan hasil yang lebih tinggi angka tutupan biofilmnya dibandingkan dengan suhu  $20^{\circ}C$  dan  $25^{\circ}C$ . Suhu  $20^{\circ}C$  menunjukkan angka BCR yang paling rendah. Hasil BCR ini berbanding lurus dengan kenaikan suhu sampai  $30^{\circ}C$  (Tabel 2).

Hasil ini sesuai dengan penelitian [16] yang menunjukkan bahwa beberapa bakteri menunjukkan kemampuan optimal membentuk biofilm pada suhu  $32^{\circ}C$  dibandingkan dengan suhu  $37$  dan  $18^{\circ}C$ . Hasil ini juga dikuatkan dengan penelitian [17] yang menunjukkan bahwa *V. Cholerae* non-O1 dan *V. Cholerae* O1 juga menunjukkan hasil yang sama, bahwa suhu  $30^{\circ}C$  meskipun sedikit lebih rendah hasil pembentukan biofilmnya jika dibandingkan suhu  $37^{\circ}C$ , tetapi tidak signifikan dalam analisis statistika.

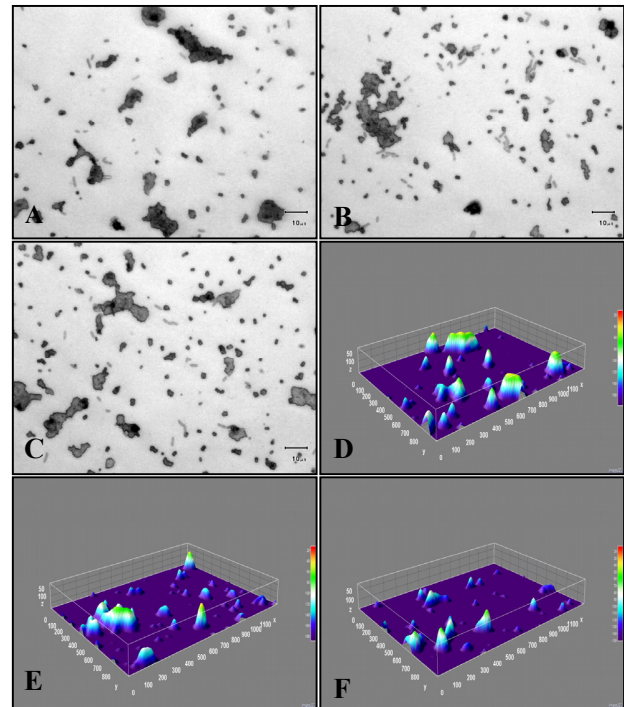
**Tabel 2.** BCR pada suhu yang berbeda

suhu	Total koloni	Total Area	BCR (%)
$20^{\circ}C$	148	104.568.000	8,5
$25^{\circ}C$	240	114.140.000	9,3
$30^{\circ}C$	227	136.620.000	11,1

### Pengaruh Kondisi Kultur terhadap BCR dan Visual 3D Biofilm

Kondisi kultur penumbuhan biofilm terlihat bahwa kultur statis menunjukkan hasil pembentukan biofilm yang jauh lebih besar. Besaran tutupan pada biofilm *V. Cholerae* yang ditumbuhkan dalam kondisi statik menunjukkan hasil tutupan delapan kali lebih besar dibandingkan dengan kultur dinamik. Pada kondisi dinamis, *shaking* mengakibatkan bakteri semakin susah untuk menempel. Kemampuan bakteri untuk

dapat menempel pada permukaan substrat merupakan parameter penting dalam pembentukan biofilm



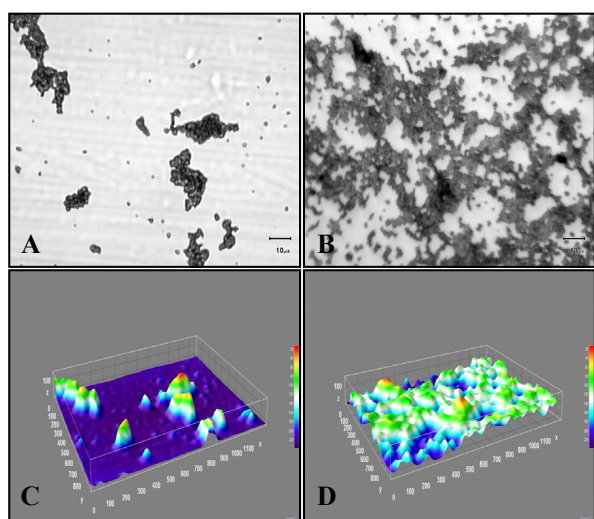
Gambar 2. Fase kontras dan 3D *surface plot* pengaruh suhu terhadap pembentukan biofilm. A) fase kontras suhu  $20^{\circ}C$ ; B) fase kontras suhu  $25^{\circ}C$ ; C) fase kontras suhu  $30^{\circ}C$ ; D) 3D *surface plot* suhu  $20^{\circ}C$ ; E) 3D *surface plot* suhu  $25^{\circ}C$ ; F) 3D *surface plot* suhu  $30^{\circ}C$ .

Permukaan *cover slip* yang terbuat dari kaca membuat permukaan lebih licin sehingga ketika mengalami pengocokan akan menimbulkan eksopolisakarida yang dikeluarkan bakteri tidak dapat menempel dengan baik [18]. Penelitian [19] yang membandingkan beberapa metode pembiakan seperti *reactor CDC biofilm*, *drip flow reactor* menunjukkan penurunan pembentukan biofilm jika dalam kondisi 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 di mana permukaan akan termodifikasi yang disebabkan oleh *absorb* beberapa komponen dalam nutrisi yang bersentuhan dengan permukaan material. Komponen tersebut dapat berupa garam-garam anorganik, protein, glikoprotein [20]. Sehingga semakin licin permukaan maka semakin kecil kemungkinan nutrisi menetap lama untuk bersentuhan dengan permukaan substrat sebagai akibat pergesekan saat *shaking* dilakukan.



**Tabel 3.** BCR pada suhu yang berbeda

Kultur	Total koloni	Total Area	BCR (%)
dinamik	57	99.468.000	8,1
statik	141	650.248.000	52,9



**Gambar 3.** 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.

### Simpulan

*Image-J* mampu menghitung dan menggambarkan angka tutupan dengan baik dan dapat dijadikan alternatif *software* analisis biofilm bakteri sehingga dapat diketahui bahwa faktor lingkungan pH, suhu, salinitas dan kondisi kultur mampu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pembentukan biofilm *Vibrio Cholerae* El Tor.

### Daftar Pustaka

- [1] Wirtanen, G., Saarela, M. and Mattila-Sandholm, T. 2000. *Biofilms: impact of hygiene in food industries*. In *Biofilms II: Process Analysis and Applications* ed Bryers, J.D. Wiley-Liss. New York. pp. 327–372.
- [2] Kim, K. Y. and Frank, J. F. 1995., Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *Journal of Food Protection*. 58 (1): 24–28.
- [3] Kumar, C. G. and Anand, S. K., 1998. A review: Significance of microbial biofilms in food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 42 (1): 9–27.
- [4] Møretrø, T. and Langsrud, S., 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*. 1: 107–121.
- [5] Prihanto, A.A. 2009. Skrining isolat bakteri Quorum Sensing Inhibitor (QSI) sebagai agen penghambat biofilm *Vibrio Cholerae* El Tor. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. p. 73.
- [6] Gu F., Lux R., Du-Thumm L., Stokes I., Kreth J., Anderson M.H., Wong D.T., Wolinsky L., 2005. In situ and non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. *Journal of Microbiology Methods* 62: 145–160.
- [7] Singleton, S., Treloar R., Warren P., Watson G.K., Hodgson R., and Allison C. 1997. Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. *Adv. Dent. Res.* 11: 133–149.
- [8] Kämper, M., Vetterkind S., Berker R., and Hoppert M. 2004. Methods for in situ detection and characterization of extracellular polymers in biofilms by electron microscopy. *Journal of Microbiology Methods* 57: 55–64.
- [9] Gottenbos, B., Mei, H.C.V.D., and Bussche, H.J., 1999. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology*. 310: 523–33.
- [10] Adachi, K., Tsurumoto, T., Yonekura, A., Nishimura, S., Kahyama, S., Hirakata, Y., and Shindo, H. 2007. New quantitative image analysis of *Staphylococcus* biofilm on the surfaces of non translucent metallic biomaterial. *J Orthop Sci*. 12: 178–184.
- [11] Wulff, N.A., Mariano, A.G., Gaurivaud, P., Souza, L.C.A., Virgí'lio, A.C.D., and Monteiro., 2008. Influence of culture medium pH on growth, aggregation, and biofilm formation of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol*. 57: 127–132.
- [12] Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelter, N., and Steward, P.S. 2003. A Microtiter plate screening method for biofilm disinfectant and removal. *Journal of Microbiology Method*. 54: 269–276.
- [13] Hasman, H., Bjerrum, M.J., Christiansen, L.E., Hansen, H.C.B., and Aarestrup, F.M., 2009. The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth

- media. *Journal of Microbiological Methods*. 78: 20–24.
- [14] Baron S., 1996. *Medical Microbiology*. 4th edition. Editor. Galveston (TX): University of Texas. USA.
- [15] Giaorius, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., 2005. 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. *Journal of food protection*. 68 (10): 2149–2154.
- [16] Bonaventura, G.D., Stepanovic, S., Picciani, Pompilo, A., Piccolomoni, R. 2007. Efek of environmental factors on Biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia microbiol*. 52 (1): 86–90.
- [17] Hostacka, A., Ciznara, I., Stefkovicova., 2010. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiol*. 55 (1), 75–78.
- [18] Hood, S.K., Zottola, E.A., 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*. 37: 145–153.
- [19] Coenye T. and Nelis, H.J., 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 83: 89–105.
- [20] Busscher HJ, Cowan MM, Van der Mei HC. 1997. Physico-Chemical interactions in initial Microbial Adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*. 2 (1): 24–32.