



OPTIMASI WAKTU PEMBENTUKAN BIOFILM BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 DAN *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Luthfiana Nurulin Nafi'ah^{1*}, Bagus Riyanto², Sukarno³

^{1,2,3} Program Studi Farmasi, Institut Teknologi Kesehatan Cendekia Utama Kudus, Jawa Tengah, Indonesia

*Alamat Korespondensi: luthfianacnut@gmail.com

Abstract: Biofilms are communities of microorganisms attached to a surface and embedded in an extracellular polymeric matrix produced by the microorganisms. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 are capable of protecting themselves from host defenses by forming biofilms. Biofilm-forming bacteria can resist host immune responses and survive under unfavorable environmental conditions, such as extreme pH, extreme temperatures, and low oxygen levels. The duration of biofilm formation is an important factor influencing bacterial growth and biofilm development. This study aimed to determine the optimal time required for *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 to form biofilms. In this study, bacterial suspensions of *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were prepared and incubated for varying durations of 24, 48, 72, 96, 120, and 144 hours. The results showed that absorbance values increased at incubation times of 24, 48, 72, 96, and 120 hours, but decreased at 144 hours. These findings indicate that the optimal incubation time corresponds to the stationary phase of bacterial biofilm formation.

Keywords: Biofilm, Optimization of formation time, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstrak: Biofilm adalah sekelompok mikroorganisme yang melekat pada suatu permukaan yang diselubungi oleh matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroorganisme tersebut. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri yang mampu mempertahankan diri dari gangguan tubuh inang dengan cara membentuk biofilm. Bakteri yang membentuk biofilm dapat mempertahankan diri dari gangguan tubuh inang serta mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang buruk seperti pH ekstrem, suhu ekstrem dan tipisnya kandungan oksigen. Waktu pembentukan biofilm merupakan faktor penting dalam pertumbuhan bakteri dalam membentuk biofilm. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui waktu optimum kemampuan bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 dalam membentuk sebuah biofilm. Metode penelitian yaitu bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 dibuat suspensi bakteri kemudian diinkubasi dengan variasi waktu 24,48,72, 96,120 dan 144 jam. Hasil penelitian optimasi waktu pembentukan biofilm menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi selama 24,48,72,96 dan 120 jam terjadi peningkatan nilai absorbansi, sedangkan pada 144 jam terjadi penurunan nilai absorbansi. Hasil optimasi waktu inkubasi termasuk fase stasioner dalam pembentukan biofilm bakteri.

Kata kunci: Biofilm, Optimasi waktu pembentukan, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Biofilm adalah kumpulan mikroorganisme terorganisir yang hidup dalam matriks polimer ekstraseluler yang mereka produksi dan melekat secara permanen pada permukaan hidup. Pembentukan zat polimer ekstraseluler (EPS) terjadi pada tahap perlekatan sebuah biofilm ke permukaan alat medis. Bakteri yang bersentuhan dengan permukaan perangkat medis akan mengeluarkan polimer yang menciptakan matriks yang

Received: May 10, 2026; Revised May 13, 2026; Accepted: May 22, 2026; Online Available: May 23, 2026;

Published: May 22, 2026;

digunakan untuk membentuk biofilm (Jamal *et al.*, 2018). Matriks ekstraseluler sebagian besar merupakan campuran polisakarida dari protein dan asam nukleat. Matriks polimer ekstraseluler mikroorganisme dinamakan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) adalah suatu zat yang dibentuk oleh mikroorganisme dan dapat menjaga mikroorganisme dari kondisi lingkungan yang buruk (Lestari *et al.*, 2017).

Bakteri yang membentuk biofilm dapat mempertahankan diri dari gangguan tubuh inang serta mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang buruk seperti pH ekstrim, suhu ekstrim dan tipisnya kandungan oksigen (Kining *et al.*, 2015). Bakteri yang membentuk suatu biofilm mempunyai pertahanan yang lebih kuat terhadap pengobatan antibiotik. Resistensi terhadap pengobatan antibiotik merupakan masalah besar yang sering terjadi di rumah sakit. Salah satu bakteri yang dapat mengakibatkan penyakit infeksi dan dapat membentuk biofilm adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Periasamy *et al.*, 2012).

S. aureus adalah bakteri patogen yang biasanya berada pada pasien yang mempunyai luka kronis (Fitria *et al.*, 2018). Pembentukan biofilm dipengaruhi oleh beberapa faktor penting diantaranya sintesis polisakarida intraseluler adhesi oleh organisme. Pembentukan biofilm oleh *S. aureus* bergantung pada keberadaan gen *ica*, yaitu gen operon yang terdiri dari *ica A*, *B*, *C* dan *D*, yang dapat menghasilkan polisakarida adhesin atau *polisakarida intraseluler adhesin* (PIA) atau *polimer N-asetil-glukosamin* (PNAG) (Cramton *et al.*, 1999).

P. aeruginosa merupakan bakteri gram negatif yang sering dijumpai sebagai penyebab infeksi oportunistik, namun juga dapat muncul pada pasien imunokompeten. Distribusinya luas serta kemampuan adaptasinya yang bagus menyebabkan bakteri ini sering menimbulkan infeksi pada manusia. Manifestasi klinis infeksi *P. aeruginosa* bervariasi dari infeksi lokal pada kulit hingga penyakit yang mengancam nyawa. *P. aeruginosa* memiliki tiga autoinducer yang akan mengontrol kemampuan bertahan hidup, pembentukan biofilm dan pembentukan faktor virulensi (Janshen, 2017).

Tahapan pembentukan biofilm dimulai dari pelekatan bakteri pada permukaan suatu benda, adhesi bakteri dan sekresi zat polimer ekstraseluler, pematangan biofilm melalui pembentukan koloni, dan pelepasan sel bakteri serta pembentukan struktur biofilm baru. Adapun faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm diantaranya suhu, pH, ketersediaan nutrisi, keadaan lingkungan dan permukaan alat medis (Zhao *et al.*, 2023). Faktor tersebut menyebabkan kemampuan bakteri dalam pembentukan biofilm berbeda-beda. Pembentukan biofilm membutuhkan kondisi yang optimum dan waktu yang tepat

untuk hasil yang akurat. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu optimum kemampuan bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 dalam membentuk sebuah biofilm.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, timbangan analitik, jarum ose, bunsen, mikropipet dan tip, inkubator, cawan petri, oven, hotplate, tabung reaksi, sentrifugasi, *Laminar Air Flow* (LAF), spektrofotometer UV-Vis, *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 well*, dan *I Mark-Biorad Microplate Reader*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 yang tidak memerlukan persetujuan etik khusus, serta media yang digunakan adalah Nutrien agar dan Nutrien broth. Bahan lain adalah larutan kristal violet 1%, etanol 96% dan aquadest.

Pembuatan Media Agar

Serbuk nutrien agar sebanyak 20 gram dilarutkan ke dalam 1 liter aquadest di dalam erlenmeyer kemudian dipanaskan dan dilarutkan di atas hotplate. Serbuk nutrien broth ditimbang sebanyak 13 gram dan dilarutkan dengan 1 liter aquades di dalam erlenmeyer kemudian dipanaskan dan diaduk menggunakan stirer di atas hotplate hingga larut. Cawan petri dan tabung reaksi dibungkus menggunakan kertas buram, tip mikropipet dan alat yang akan dipakai disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Radji, 2010).

Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri adalah cara untuk memelihara bakteri agar tetap tumbuh dengan baik. Peremajaan tersebut menggunakan media agar miring NA steril. Stok bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 diambil menggunakan ose steril yang digoreskan pada permukaan agar miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Kursia *et al.*, 2020).

Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan cara bakteri yang sudah ditanam pada media nutrein agar miring diambil 1 ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi media Nutrien Broth sebanyak 9 ml

yang sudah disterilkan. Kekeruhan suspensi bakteri disesuaikan dengan kekeruhan *McFarland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) (Dalynn, 2014).

Optimasi Waktu Pembentukan Biofilm

Sebanyak 200 μ l suspensi bakteri dimasukkan ke tiap well microplate kemudian dioptimasi waktu inkubasinya. Variasi waktu yang digunakan adalah 24, 48, 72, 96, 120, dan 144 jam. Microplate dibilas menggunakan air mengalir, kemudian ditambahkan larutan kristal violet 1% sebanyak 200 μ l pada tiap well dan didiamkan selama 15 menit. Microplate dibilas dengan air mengalir, kemudian ditambahkan larutan etanol 96% sebanyak 200 μ l ke dalam microplate, kemudian dibaca absorbansinya menggunakan alat *iMark-Biorad Microplate Reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Waktu pembentukan dengan nilai absorbansi terbesar digunakan sebagai acuan untuk inkubasi pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Chaerunisa, 2015).

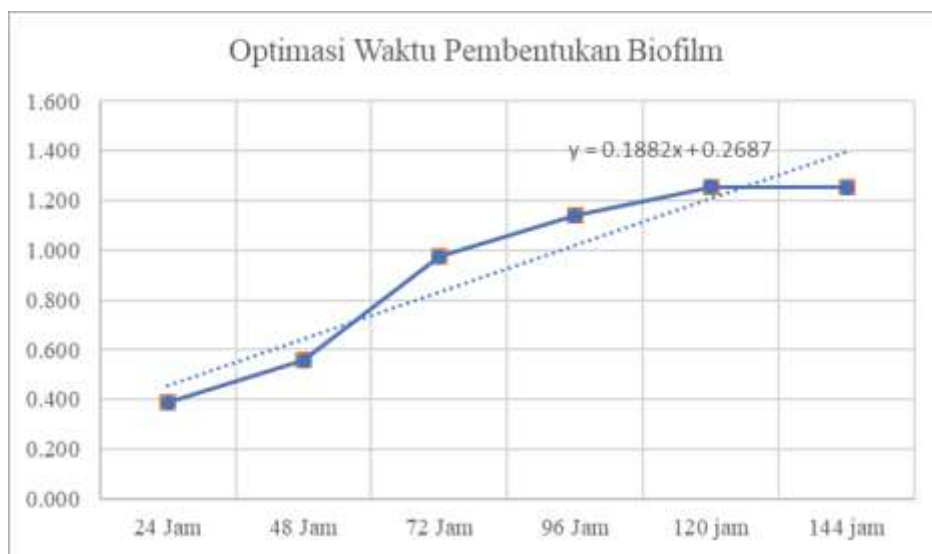
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi waktu pembentukan biofilm bertujuan untuk mengetahui waktu optimum bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 dalam membentuk biofilm terbaik. Varian waktu optimasi yang digunakan adalah 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, 120 jam dan 144 jam. Suspensi bakteri sebelum dilakukan optimasi waktu pembentukan biofilm kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan *McFarland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL).

Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 mempunyai nilai rata-rata absorbansi pada inkubasi 24 jam yaitu $0,386 \pm 0,04$; pada inkubasi 48 jam yaitu $0,558 \pm 0,08$; pada inkubasi 72 jam yaitu $0,975 \pm 0,07$; pada masa inkubasi 96 jam yaitu $1,140 \pm 0,03$; pada masa inkubasi 120 jam yaitu $1,255 \pm 0,04$, dan pada masa inkubasi 144 jam yaitu $1,252 \pm 0,09$. Hasil optimasi waktu biofilm bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada tabel 1 dan hasil optimasi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 1. Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* ATCC 25923

No.	Absorbansi					
	24 Jam	48 Jam	72 Jam	96 Jam	120 Jam	144 Jam
1	0,340	0,483	0,874	1,108	1,289	1,326
2	0,420	0,570	1,053	1,142	1,246	1,229
3	0,452	0,663	0,975	1,121	1,263	1,025
4	0,366	0,640	0,923	1,152	1,301	1,322
5	0,313	0,609	1,025	1,075	1,219	1,367
6	0,344	0,607	1,023	1,127	1,196	1,281
7	0,442	0,530	0,967	1,103	1,309	1,238
8	0,408	0,432	0,993	1,105	1,195	1,233
9	0,388	0,434	0,820	1,199	1,244	1,267
10	0,396	0,502	0,935	1,187	1,251	1,245
Rata-rata	0,387 ± 0,04	0,547 ± 0,08	0,959 ± 0,07	1,132 ± 0,03	1,251 ± 0,04	1,253 ± 0,09



Gambar 1. Kurva Optimasi Waktu Pembentukan Biofilm Bakteri *S. aureus* ATCC 25923

Tabel 2. Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853

No.	Absorbansi					
	24 Jam	48 Jam	72 Jam	96 Jam	120 Jam	144 Jam
1	0,123	0,241	0,362	0,476	0,566	0,531
2	0,132	0,237	0,374	0,451	0,561	0,578
3	0,101	0,265	0,392	0,456	0,548	0,514
4	0,142	0,258	0,346	0,412	0,532	0,533
5	0,137	0,282	0,321	0,458	0,566	0,557
6	0,116	0,255	0,378	0,461	0,522	0,578
7	0,152	0,234	0,356	0,421	0,536	0,545
8	0,115	0,278	0,388	0,489	0,546	0,525
9	0,123	0,246	0,369	0,434	0,534	0,517
10	0,147	0,242	0,395	0,467	0,578	0,508
Rata-rata	0,129 ± 0,02	0,254 ± 0,02	0,368 ± 0,02	0,453 ± 0,02	0,549 ± 0,02	0,539 ± 0,03



Gambar 2. Kurva Optimasi Waktu Pembentukan Biofilm Bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853

Hasil rata-rata optimasi waktu pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dengan waktu inkubasi selama 24 jam yaitu $0,387 \pm 0,04$; pada 48 jam yaitu $0,547 \pm 0,08$; pada 72 jam yaitu $0,959 \pm 0,07$; pada 96 jam yaitu $1,132 \pm 0,03$; pada 120 jam yaitu $1,251 \pm 0,04$ dan pada 144 jam yaitu $1,253 \pm 0,09$. Sedangkan pada hasil rata-rata optimasi waktu pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan waktu inkubasi selama 24 jam yaitu $0,129 \pm 0,02$; pada 48 jam yaitu $0,254 \pm 0,02$; pada 72 jam yaitu $0,368 \pm 0,02$; pada 96 jam yaitu $0,453 \pm 0,02$; pada 120 jam yaitu $0,549 \pm 0,02$ dan pada 144 jam yaitu $0,539 \pm 0,03$.

Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi selama 24, 48, 72, 96, 120 jam terjadi peningkatan nilai absorbansi, sedangkan pada 144 jam nilai absorbansi stabil dan mengalami penurunan. Hal ini dibuktikan dengan uji statistik *One Way Anova* pada kedua bakteri didapatkan nilai signifikansi $p < 0,000$ yang menandakan data berbeda signifikan dari masing-masing nilai absorbansi. Analisis dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey* untuk menentukan kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan. Hasil uji *post hoc Tukey* menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 24, 48, 72, 96, 120 jam terjadi perbedaan signifikan, sedangkan pada jam 120 dan 144 jam tidak menunjukkan perbedaan. Hal ini dapat dilihat pada gambar 3 dan 4.

Nilai Absorbansi

Tukey HSD^a

Waktu Pembentukan Biofilm <i>S.aureus</i>	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
24 jam	10	.38690				
48 jam	10		.54700			
72 jam	10			.95880		
96 jam	10				1.13190	
120 jam	10					1.25130
144 jam	10					1.25330
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Gambar 3. Hasil Analisis Uji *Post hoc Tukey* Bakteri *S. aureus* ATCC 25923

Nilai Absorbansi

Tukey HSD^a

Waktu Pembentukan Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
24 jam	10	.12880				
48 jam	10		.25380			
72 jam	10			.36810		
96 jam	10				.45250	
144 jam	10					.53860
120 jam	10					.54890
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.878

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Gambar 4. Hasil Analisis Uji *Post hoc Tukey* Bakteri *P. Aeruginosa* ATCC 27853

Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm diketahui bahwa pada variasi waktu terdapat tingkat kekeruhan suspensi bakteri yang berbeda. Tingkat kekeruhan suspensi bakteri sebanding dengan fase pertumbuhan bakteri yang terjadi selama waktu inkubasi. Lamanya waktu inkubasi mempengaruhi fase pertumbuhan bakteri. Fase pertumbuhan bakteri terdiri dari 4 fase, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian (Fitri *et al.*, 2015). Fase pertumbuhan bakteri dimulai dari fase lag sebagai periode pengenalan bakteri terhadap media baru dan belum mulai bereplikasi. Fase selanjutnya yaitu fase log atau eksponensial yaitu periode bakteri mulai bereplikasi pada media yang baru. Fase eksponensial ini akan terus meningkat sampai masuk ke fase stasioner, dimana pertumbuhan bakteri akan konstan. Fase terakhir adalah fase kematian dimana bakteri tidak bisa bereplikasi bahkan mati (Compean & Ynalvez, 2014).

Pada penelitian ini, biofilm mengalami fase log atau eksponensial sampai pada 72 jam karena selama waktu tersebut pertumbuhan bakteri mengalami peningkatan yang signifikan.

Pada waktu inkubasi 96 jam dan 120 jam masih terlihat pertumbuhan bakteri, tetapi kenaikan jumlah bakteri agak berkurang. Sedangkan pada waktu inkubasi 120 sampai 144 jam pertumbuhan bakteri mengalami penurunan meskipun hanya selisih sedikit. Waktu inkubasi yang optimum untuk pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 adalah dari 72 – 120 jam. Hal ini diduga waktu inkubasi selama 72 – 120 jam telah mencapai fase stasioner pada pembentukan biofilm. Pada penelitian Fitri *et al.* (2015) bakteri yang mencapai fase stasioner dan belum mengalami penurunan kekeruhan terjadi setelah inkubasi selama empat hingga enam hari.

Pembentukan biofilm terjadi dalam beberapa tahap, pertama yaitu pelekatan bakteri ke permukaan benda. Sel mikroba menempel ke permukaan melalui pelengkap seperti pilli, flagela dan dapat terikat melalui gaya fisik seperti gaya *Van der Waals* dan interaksi elektrostatis. Fimbriae, pilli dan flagela memberi kekuatan pada interaksi antara bakteri dan permukaan perlekatan. Permukaan yang hidrofobik juga berperan dalam memperkuat keterikatan mikroba, karena mengurangi kekuatan tolakan antara bakteri dan permukaan (Jamal *et al.*, 2018). Faktor yang mempengaruhi perlekatan sel bakteri dalam pembentukan biofilm antara lain sifat permukaan, kondisi film, hidrodinamik, karakteristik media cair dan keadaan permukaan sel bakteri (Costerton & Stewart, 2001).

Tahap kedua, yaitu pembentukan mikro koloni bakteri. Proses terjadinya perlekatan mikroorganisme ke permukaan biotik atau abiotik, selanjutnya proses pembelahan sel mikroba dimulai, dimulai melalui pensinyalan kimiawi tertentu di dalam EPS. Proses selanjutnya mengarah pada pembentukan koloni mikro. Koloni bakteri dalam biofilm biasanya terdiri dari banyak jenis komunitas mikro. Komunitas mikro ini berkoordinasi satu sama lain dalam berbagai aspek. Koordinasi ini memainkan peran penting dalam pertukaran substrat, distribusi produk metabolisme penting dan ekskresi produk akhir metabolik. Tahap pembentukan mikro koloni membutuhkan pelekatan antar bakteri. Pelekatan antar sel bakteri *Staphylococcus* dipengaruhi oleh *polisakarida intraseluler adhesin* (PIA) (Limoli *et al.*, 2015). Gen yang berperan dalam pelekatan antar bakteri adalah gen *ica*, yaitu gen yang mengkode produksi *polisakarida intraseluler adhesin* (PIA). Gen *ica* terdiri dari gen *ica A*, *B*, *C* dan *D* (De Silva *et al.*, 2002).

Tahap ketiga, yaitu pematangan dan pembentukan koloni bakteri. Tahap pembentukan biofilm sel mikroba berkomunikasi dengan satu sama lain melalui sinyal induser otomatis. Komunikasi sel ke sel merupakan proses penting, selama dimana kepadatan sel mikroba yang dibutuhkan tercapai. Mengarah ke sekresi molekul pensinyalan, yang dikenal sebagai penginduksi otomatis. Penginduksi otomatis ini memfasilitasi penginderaan kuorum. Tahap

pematangan produk gen tertentu diekspresikan, yang dianggap penting untuk pembentukan EPS (Jamal *et al.*, 2018). EPS dapat mempengaruhi adhesi permukaan, pembentukan biofilm bakteri, struktur internal biofilm, saling pengenalan antar sel, sistem transduksi sinyal, perolehan nutrisi, pemeliharaan sel dan pertukaran informasi genetik (Zhao *et al.*, 2023).

Tahap terakhir yaitu pelepasan atau *disperse* biofilm. Sel mikroba dalam biofilm melakukan pembelahan dan dispersi secara cepat untuk mengubah dari sesil menjadi bentuk motil. Proses pelepasan, komunitas mikroba dalam biofilm menghasilkan enzim sakarolitik berbeda yang membantu melepaskan permukaan mikroba ke area baru untuk kolonisasi. Fase ini sel mikroba mengatur ekspresi protein yang terikat dengan pembentukan flagela, untuk membiarkan bakteri bergerak ke situs baru (Jamal *et al.*, 2018). Perubahan faktor lingkungan seperti suhu, pH, oksigen dan kadungan nutrisi dapat mempengaruhi proses *disperse* biofilm bakteri.

Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri patogen yang berkoloni dan mampu menyebabkan infeksi yang terdapat di rumah sakit. *S. aureus* mampu menghasilkan matriks ekstraseluler yang membantu kelangsungan hidup di lingkungan yang ekstrim dan memungkinkan perlekatan awal dan pembentukan biofilm (Alonso *et al.*, 2021). Biofilm *S. aureus* tumbuh menjadi lapisan-lapisan sel tebal membentuk populasi biofilm sehingga menjadi mikrokoloni. Proses perkembangan biofilm *S. aureus* terdiri dari 5 tahap yaitu perlekatan, multiplikasi, eksodus, pematangan dan penyebaran. Pertama bakteri *S. aureus* menempel pada permukaan abiotik atau biotik melalui interaksi hidrofobik atau matriks ekstraseluler. Setelah menempel biofilm akan berkembang menjadi mikrokoloni yang terdiri dari eDNA dan matriks protein. Selanjutnya tahap eksodus yaitu sel bakteri dilepaskan dari biofilm melalui degradasi eDNA yang dimediasi inti sel untuk membentuk mikrokoloni tiga dimensi. Mikrokoloni terbentuk dari sel-sel bakteri yang tetap menempel selama tahap eksodus. Tahap ini ditandai dengan pembelahan sel cepat yang membentuk agregasi kuat yang terdiri dari protein dan eDNA. Tahap akhir yaitu penginderaan kuorum yang berawal dari Agr yang diaktifkan untuk membentuk modulasi matriks biofilm dan penyebaran sel melalui aktivasi protein (Moormeier & Bayles, 2017).

Siklus pembentukan biofilm oleh bakteri *P. aeruginosa* ada media glukosa dimulai pada 2 jam pertama, yaitu tahap dimana bakteri planktonik mulai melekat pada pertumbuhan alat atau lingkungan abiotik, kemudian dalam 8 jam berikutnya membentuk perlekatan yang bersifat tetap atau *irreversible*. Melekatnya bakteri ini akan membentuk quorum sensing dan membentuk mikrokoloni dengan mulai membentuk EPS sebagai matriksnya dalam waktu 14

jam. Mikrokoloni akan semakin berkembang menjadi biofilm yang matang dan kuat dengan struktur EPS. Biofilm yang matang ini tercapai pembentukannya dalam waktu 1-3 hari setelah terjadi perlekatan bakteri (Homenta, 2016).

Pembentukan biofilm pada penelitian ini menggunakan alat microplate yang berbahan dasar plastik, karena bakteri lebih cenderung melekat pada bahan plastik. Pembentukan biofilm dapat terjadi pada berbagai jenis permukaan dan berbagai kondisi lingkungan. Bakteri lebih cenderung melekat pada permukaan hidrofobik dan permukaan nonpolar seperti plastik dari pada permukaan yang hidrofilik seperti logam atau kaca (Jamal *et al.*, 2018).

Proses perlekatan bakteri juga dipengaruhi oleh kondisi film. Permukaan yang terendam oleh media cair akan ditutupi oleh polimer dari media sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perluasan dari perlekatan mikroorganisme (Costerton & Stewart, 2001). Perlekatan mikroba pada permukaan benda dipengaruhi oleh karakteristik dari media cair yang digunakan, misalnya pH, suhu, taraf nutrisi dan kekuatan ion. Pengendalian suhu pada penelitian ini dilakukan pada proses inkubasi, yaitu pada suhu 37°C.

Sifat hidrodinamik juga dapat mempengaruhi tingkat dan luasnya perlekatan bakteri misalnya karakteristik kecepatan cairan. Selain itu tingkat perlekatan bakteri dipengaruhi oleh keadaan permukaan sel bakteri misalnya produksi *polimer ekstraseluler* (EPS), hidrofobitas permukaan sel, serta adanya fimbriae dan flagela (Mahami & Adu-gyamfi, 2011). Sifat fisikokimia sel bakteri pada permukaan benda menentukan apakah bakteri menempel pada permukaan hidrofilik atau hidrofobik. Selain itu faktor fisik yang mempengaruhi perlekatan mikroorganisme adalah muatan permukaan. Permukaan bermuatan positif memudahkan menempelnya bakteri, sedangkan muatan negatif menghalangi bakteri menempel. Gugus amino, karboksil dan fosfat di sebagian besar sel bakteri memberikan muatan negatif (Zhao *et al.*, 2023).

Bakteri *S. aureus* membentuk biofilm yang lebih padat dan tebal karena jumlah *polisakarida intraseluler adhesion* (PIA) melimpah, yang sangat efektif dalam mengikat pewarna kristal violet. Sedangkan pada bakteri *P. Aeruginosa*, matriks biofilm yang terbentuk lebih tipis dan dinamis, sehingga lebih cepat mengalami pelepasan atau disosiasi (Scaffo *et al.*, 2025). Akibatnya, absorbansi yang terbaca lebih rendah dibandingkan dengan hasil absorbansi biofilm bakteri *S. aureus*. Hal ini yang mempengaruhi perbedaan hasil nilai absorbansi antara bakteri, di mana bakteri *S. aureus* memiliki nilai absorbansi lebih tinggi dibandingkan bakteri *P. aeruginosa*.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, waktu inkubasi yang termasuk fase stasioner dalam pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* yaitu antara 72 jam sampai 120 jam. Sehingga waktu tersebut dapat digunakan sebagai kondisi optimum produksi biofilm. Faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm antara lain pH, suhu, keadaan nutrisi, sifat permukaan, kondisi film, hidrodinamik, karakteristik media cair, dan keadaan permukaan sel bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, B., Pérez-Granda, M. J., Latorre, M. C., Sánchez-Carrillo, C., Bouza, E., Muñoz, P., & Guembe, M. (2021). Production of biofilm by *Staphylococcus aureus*: association with infective endocarditis enfermedades infecciosas microbiologia clinica, 40, 418–422.
- Chaerunisa, R. (2015). Pengujian aktivitas biofilm *Staphylococcus aureus* oleh seduhan daun teh putih (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Compean, K.L & Ynalvez, R. A. (2014). Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: a review. *Research Journal of Medicinal Plants* 8(5): 204-213.
- Costerton, J. ., & Stewart, P. S. (2001). *Battling Biofilms*. Scientific American.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, 67(10), 5427–5433.
- Dalynn, B. (2014). *Mc Farland Standard*. Mc Farland Standards For In Vitro Use Only, 2.
- Fitri K, S. A., K. Agung, M. U., & Meika, J. (2015). Skrining antibakteri produk ekstra sel eksosimbion bakteri laut pada makroalga terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Jurnal Akuatika Indonesia*, 6(2), 128–139.
- Fitria, A., Nugraha, A. T., Meliani, Y., & Choiriah, A. (2018). Aktivitas bakterisidal dan antibiofilm batang *Jatropha multifida* L. terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA. *Jurnal Ilmu-Ilmu MIPA*, 18, 42–55.
- Homenta. H. (2016). Infeksi biofilm bakterial. *Jurnal E-Biomedik (Ebm)*, Volume 4, Nomor 1, Januari-Juni 2016.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11. H
- Janshen, Yudha RS, Rahardjo, Reni. (2017). Aktivitas antibakteri ekstrak daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biotechnology and Bioscience*.
- Kining, E., Falah, S., & Nurhidayat, N. (2015). The in vitro antibiofilm activity of water leaf extract of papaya (*Carica papaya* L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Current Biochemistry*, 2(3), 150–163.

- Kursia, S., Imrawati, Ismail, Halim, A., Ramadhani, N., Ramadhani, F., Priska, F., & Hanifah, F. (2020). Identifikasi biokimia dan aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat limbah sayur bayam. *Media Farmasi*, 16(1), 27–32.
- Lestari, D. R. S., Soegianto, L., & Hermanu, L. S. (2017). Potensi antibakteri dan antibiofilm ekstrak etanol bunga bintaro (*Cerbera odollam*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *Journal of Pharmacy Science*, 4(1), 30–35.
- Mahami, T., & Adu-Gyamfi, A. (2011). Biofilm-associated infections: public health implications. *International Research Journal Of Microbiology (IRJM)*.
- Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 104(3), 365–376.
- Periasamy, S., Joo, H. S., Duong, A. C., Bach, T. H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 109(4), 1281–1286.
- Radji, M. (2010). *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. EGC.
- Scaffo, J., Dur, R., Dobrotka, C., Ribeiro, T. A. N., Pereira, R. F. A., Sachs, D., Ferreira, R. B. R., & Aguiar-alves, F. (2025). In vitro analysis of interactions between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm formation. *Antibiotics*, 14
- Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: from definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, April, 1–23.