**Identifikasi Biofilm pada Bakteri Penyebab Otitis Media Supuratif Kronis**

**Tipe Mukosa**

Hamsu Kadriyan, Markus Rambu, I Gusti Ayu A, Elih Sukaryatin

Departemen THT RSUPMataram/Fakultas Kedokteran Universitas Mataram

Abstrak

Kronisitas penyakit infeksi akhir-akhir ini semakin sulit dibendung, hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti timbulnya mutasi genetik bakteri sehingga tidak sensitif lagi terhadap antibiotik tertentu. Mutasi genetik ini dapat mengakibatkan perubahan pada struktur dinding sel bakteri atau mengakibatkan timbulnya pelindung bakteri seperti biofilm. Hal ini juga terjadi pada penyakit kronis di telinga seperti otitis media supuratif kronis (OMSK), terutama yang disebabkan oleh bakteri Pseudomonas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi antigen yang bertanggung jawab terhadap timbulnya biofilm pada bakteri Pseudomonas yang ditemukan pada penderita OMSK.

Penelitian dilakukan dengan metode potong lintang. Sampel dikumpulkan secara konsekutif sebanyak 35 pasien OMSK yang berkunjung ke poli THT RSUP Mataram dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan oleh peneliti. Cairan telinga tengah diambil dengan lidi kapas steril lalu dimasukkan kedalam media aerob dan anaerob. Isolasi bakteri dilakukan secara aerob dan anaerob, kemudian dianalisis secara mikroskopis dan biokimiawi. Terhadap bakteri Pseuodmonas Aeruginosa yang teridentifikasi dilakukan pemeriksaan antigen yang bertanggung jawab terhadap pembentukan biofilm dengan menggunakan RT-PCR.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri terbanyak yang ditemukan adalah bakteri pseudomonas aeruginosa 12 (34,3%) dari 35 sampel. Pemeriksaan RT-PCR terhadap 12 bakteri pseudomonas aeruginosa menunjukkan bahwa antigen lasR dan lasI dengan ketebalan 244 bp dan 226 bp ditemukan pada seluruh sampel (100%).

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil tersebut adalah bakteri Pseudomonas Aeruginosa yang diambil dari cairan telinga tengah penderita OMSK, aktif membentuk biofilm. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi biofilm pada bakteri-bakteri lain pada penderita OMSK serta penatalaksanaannya untuk mencegah berlanjutnya penyakit.

Kata kunci: Otitis media supuratif kronis, Pseudomonas Aeruginosa, Biofilm

Latar belakang

Pada dekade sebelumnya, penatalaksanaan otitis media supuratif kronik (OMSK) masih didasarkan atas jenis bakteri penyebabnya saja. Beberapa penelitian terdahulu seperti Losin dkk (1983) menunjukkan bahwa bakteri proteus merupakan bakteri yang lebih dominan pada OMSK, tetapi penelitian pada dekade terakhir menunjukkan bakteri pseudomonas lebih sering ditemukan (Wang EW dkk, 2005; Kristiawan dkk, 2007).

Pemetaan pola kuman pada OMSK sangat penting untuk diketahui mengingat penyakit ini merupakan penyakit yang cukup sering ditemukan di RSU Mataram dan selalu termasuk dalam 5 besar penyakit di bidang THT (Data Rekam Medik RSU Mataram, 2006). Hal ini juga berkaitan dengan *trend* penatalaksanaan OMSK dengan menggunakan antibiotik yang sensitif terhadap kuman yang ditemukan. Kecenderungan pola kuman yang ditemukan dapat dijadikan patokan pada penatalaksanaan pasien selanjutnya, terutama apabila isolasi kuman dan tes resistensinya tidak dapat dilakukan secara berkala. Hal ini berkaitan dengan lamanya waktu tunggu untuk memperoleh hasil kultur dan sensitivitas yang dapat mencapai 7 hari.

Bakteri-bakteri yang ada dalam tubuh kita selalu berusaha mempertahankan diri dengan berbagai cara. Pada publikasi penelitian Wang dkk (2005) bakteri-bakteri tertentu dapat menghasilkan pelindung, seperti betalaktam untuk mencegah masuknya antibiotik ke dalam tubuh bakteri. Hal ini mengakibatkan bakteri menjadi kebal terhadap antibiotik tersebut. Beberapa tahun terakhir, telah ditemukan sebuah pelapis bakteri yang disebut *biofilm*. *Biofilm* ini mengakibatkan bakteri tidak mampu ditembus oleh antibiotik yang terbukti sensitif berdasarkan uji sensitivitas, kecuali lapisan biofilm tersebut dihancurkan terlebih dahulu maka antibiotik yang sensitif tersebut dapat bekerja dengan baik untuk membunuh kuman (Wang dkk, 2005; Chole dkk, 2002). Hal inilah yang diduga sebagai salah satu penyebab terjadinya kegagalan dalam penatalaksanaan infeksi kronis di telinga tengah.

Pembentukan biofilm ini merupakan hasil mutasi genetik bakteri. Biofilm merupakan struktur biologis yang dihasilkan pada membran sel bakteri yang terdiri dari struktur polisakarida, asam nukleat, dan protein yang memungkinkan bakteri tidak dapat dimatikan atau dihambat pertumbuhannya oleh antibiotika yang terbukti sensitif terhadap bakteri tersebut (Wang dkk, 2005; Chole dkk, 2002). Bakteri dapat berkumpul dalam sebuah kantung biofilm secara berkelompok dalam bentuk planktonic (Antonelli, 2007).

Penelitian lain menunjukkan bahwa biofilm terbukti tidak berhubungan dengan otitis media kronis (Dohar JE, 2007). Hal ini menunjukkan biofilm masih merupakan hal yang kontroversial.

Berdasarkan hal tersebut, pola kuman saja tidak cukup untuk menentukan penatalaksanaan OMSK. Identifikasi biofilm juga perlu dilakukan untuk meningkatkan angka keberhasilan terapi.

Metode penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah potong lintang. Pemilihan sampel dilakukan secara konsekutif terhadap pasien yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Penderita setuju untuk mengikuti penelitian dengan menandatangani lembar persetujuan.
2. Terdapat perforasi kecil sampai subtotal pada membran timpani dan ditemukan sekret di telinga tengah pada pemeriksaan.
3. Tidak menggunakan antibiotika baik topikal maupun sistemik dalam 5 hari sebelumnya.
4. Usia > 6 tahun

Subyek akan di eksklusi bila :

1. Terdapat jaringan granulasi atau kolesteatom telinga tengah
2. Pernah operasi telinga tengah sebelumnya.
3. Penderita/tersangka penyakit imunodefisiensi

Pengumpulan bahan penelitian

Bahan pemeriksaan berupa sekret diambil di poli THT RSU Mataram dengan menggunakan lidi kapas steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung *Thioglycolate Broth* untuk biakan anaerob dan tabung *Brain Heart Infusion* (BHI) untuk biakan aerob. Bahan yang sudah terkumpul selanjutnya di bawa ke laboratorium Biomedik RSU Mataram untuk segera di proses lebih lanjut.

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan 2 cara yaitu aerob dan anaerob. Untuk biakan aerob, spesimen dalam BHI digoreskan ke media *Tryptase Soy Agar* dan BAP, sedangkan untuk anaerob spesimen dalam *Thioglycolate Broth* digoreskan ke media BAP dan *Cocolate Agar*. Inkubasi anaerob dilakukan dengan menggunakan *anaerobyc jar* (oxoid). Inkubasi dilakukan pada suhu 370C dan setiap hari diamati.

Koloni yang muncul di sub kultur selanjutnya diidentifikasi dengan 2 teknik, pertama dengan menggunakan pengamatan mikroskopik (gram stains) dan uji biokimiawi (Invicmutsi). Kedua, identifikasi dilakukan dengan PCR (metode RISA) untuk mengetahui jenis bakterinya dan juga untuk analisis biofilm pada isolat tersebut.

Prosedur pemeriksaan RT-PCR gen pembentuk biofilm

A. Ekstraksi RNA

Mula-mula 100 uL suspensi kuman Pseudomonas aeroginosa dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang berisi 300 uL larutan TriZol (Invitrogen, USA).

Lisis sel bakteri dilakukan dengan cara tabung dikocok keras-keras sebanyak 10 kali dan selanjutnya didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit.

Setelah dilakukan penambahan 200 uL chloroform, pengocokan 10 kali, tabung diputar pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.

Supernatan diambil dan dipindah ke tabung baru, kemudian ditambahkan 500uL Iso-propanol, dibolak-balik kemudian dibiarkan selama 5 menit.

Setelah dilakukan pemutaran pada 14.000 rpm selama 10 menit, RNA yang diperoleh dicuci dengan 200 uL ethanol 80% sebanyak 2 kali , dikering-anginkan dan selanjutnya dilarutkan dalam 50 uL aquades.

B. RT-PCR

Dibuat campuran pereaksi RT-PCR (SuperScript III One-Step RT-PCR System, Promega USA, Cat. No. 12574-018) dengan komposisi sebagai berikut :

25 ul 2X reaction mix

50 pmol masing – masing primer lasI dan lasR

2 ul SuperScript III RT/Platinum TaqMix

1-2 ul RNA template (0,5-1 ug ) dan

aquadest hingga 50 ul.

1. Primer Set yang dipakai adalah untuk amplifikasi gen lasI dan lasR yang dipesan pada 1st-BASE, Singapore. Produk lasI sepanjang 244 bp dan lasR 226 bp, dengan urutan sebagai berikut :

lasI-1 : 5'TGTTCAAGGAGCGCAAAGG

lasI-2 : 5'ATGGCGAAACGGCTGAGTT

lasR-1 : 5'AGCGACCTTGGATTCTCGAAG

lasR-2 : 5'CGAAGAACTCGTGCTGCTTTC

2. Pereaksi kemudian dimasukkan ke dalam mesin thermocycler (MyCycler, Biorad, USA) sebanyak 35 siklus dengan kondisi amplifikasi sebagai berikut, cDNA Sintesis (45 0C) selama 40 menit, Predwell (95 0C) selama 4 menit, denaturasi (95 0C) selama 30 detik, Annealing (55 0C) selama 30 detik, Ekstension (72 0C) selama 30 detik dan Postdwell (72 0C) selama 4 menit.

Produk PCR kemudian dianalisa menggunakan elektroforesis gel agarose 2% menggunakan pewarnaan Etidium Bromide. Gel diamati dan didokumentasikan menggunakan alat GelDoc (Biorad, USA)

Hasil

Isolasi bakteri yang ditemukan pada pasien OMSK diperoleh sebanyak 8 spesies bakteri, Pseudomonas aeroginosa merupakan bakteri yang paking sering ditemukan (34,2%). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Pola kuman pada pasien OMSK di RSU Mataram

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| No  | Jenis Bakteri | Jumlah Pasien  | Persentase (%) |
| 1 | *Stap. aureus* | 9 | 25,7 |
| 2 | *Ps aeroginosa* | 12 | 34,2 |
| 3 | *Pr. vulgaris* | 2 | 5,7 |
| 4 | *Pr. rutgeri* | 2 | 5,7 |
| 5 | *En. agglomerans* | 1 | 2,9 |
| 6 | *Strep. pyogenes* | 6 | 17,1 |
| 7 | *Kl. pneumoniae* | 2 | 5,7 |
| 8 | *Ps. putrefaciens* | 1 | 2,9 |
|  | *Total* | 35 | 100 |

Dari 12 isolat Pseudomonas aeruginosa yang diperiksa, semuanya (100%) menunjukkan hasil positif untuk deteksi RNA gen lasI dan lasR (gambar 1). Berarti kedua gen tersebut sedang aktif (*transcription*) memproduksi biofilm.

 

Gen 1ast 244 bp Gen 1asR 228 bp

Gambar 1. Hasil pemeriksaan PCR biofilm

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bakteri Pseudomonas aeroginosa merupakan bakteri terbanyak pada pasien otitis media supurative kronis di RSU Mataram, yaitu sebesar 34,2%. Bakteri lain yang cukup banyak ditemukan adalah stapilokokus aureus (25,7 %) dan streptokokus pyogenes (17,1%). Hasil penelitian Wang EW dkk (2005) menunjukkan Coagulase negatif stapilokokus ,erupakan bakteri terbanyak yang ditemukan ada jaringan kolestetaom (29%), sedangkan pseudomonas ditemukan sebanyak 21,1%. Kristiawan AR dkk (2007) di semarang menemukan 17,9% pseudomonas.

Pada penelitian ini, dari 12 isolat pseudomonas aeroginosa yang diperoleh dari cairan telinga tengah penderita otitis media kronis tipe aman, (100%) aktif mentranskripsi gen lasI dan lasR. Wang dkk (2005) menemukan hubungan yang sangat kuat antara pseudomonas terebntuknya biofilm pada kolesteatom dengan pemeriksaan RT-PCR.

Terbuktinya pseudomonas aeroginosa sedang aktif membentuk biofilm dapat dijadikan sebagai titik tolak menata kembali cara penatalaksanaan otitis media kronis di Indoneisa khususnya maupun dunia secara umum. Hal ini dikaitkan dengan kegagalan terapi OMSK sehingga menimbulkan semakin meningkatnya kasus tersebut. Menurut Antonielli (2007), peranan biofilm pada mekanisme resistensi bakteri terhadap antiobiotik dapat melalui berbagai cara, antara lain terbentuknya pola planktonik, peningkatan produksi strain beta laktamase pseuodomonas, dan adanya subpopulasi super resisten.

Kaji dkk, (2008) menemukan bahwa bakteri haemofilus influenza yang terdapat di dalam kantong biofilm sulit dimatikan. Percobaan dengan eritromisin, cefotaxim dan ampisilin sama sekali tidak dapat membunuh bakteri dalam kantong biofilm tersebut, sedangkan gatifloksasin dapat membunuh bakteri.

Kelemahan pada penelitian adalah karena hanya menggunakan gen lasR dan lasI saja untuk mendeteksi aktifitas pembentukan biofilm padahal banyak sekali gen-gen lainnya yang bisa diperiksa. Hal ini karena keterbatasan waktu dan biaya sehingga tidak dapat dilakukan dengan lebih ideal. Idealnya dilakukan pemeriksaan terhadap beberapa gen untuk lebih memastikannya seperti rhlR dan rhlI.

Kesimpulan

Bakteri Pseudomonas Aeruginosa yang diambil dari cairan telinga tengah penderita OMSK, aktif membentuk biofilm.

Saran

Berdasarkan hasil tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi biofilm dari bakteri-bakteri lain yang ada di telinga tengah agar nanntinya dapat dibuat protokol baru dalam penatalaksanaan OMSK

Kepustakaan

Antonelli PJ. Impact of biofilm on the treament of otitis. Ear Nose and Throat Journal 2007;86:11.

Anonim. Data rekam medik RSU Mataram. 2006

# [Chole RA](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chole%20RA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=12365883), [Faddis BT](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Faddis%20BT%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=12365883). Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. [Arch Otolaryngol Head Neck Surg.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12365883%22%20%5Co%20%22Archives%20of%20otolaryngology--head%20%26%20neck%20surgery.) 2002 Oct;128(10):1129-33

Dohar JE. Evidence that otitis media is not a biofilm disease. Nose & Throat Journal (Supp11) November 2007:8-12.

# [Kaji C](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kaji%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18285669)1, [Watanabe K](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Watanabe%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18285669), [Apicella MA](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Apicella%20MA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18285669), [Watanabe H](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Watanabe%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18285669). Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable Haemophilus influenzae isolates within biofilms. [Tohoku J Exp Med.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285669%22%20%5Co%20%22The%20Tohoku%20journal%20of%20experimental%20medicine.) 2008 Feb;214(2):121-8

# Kristiawan AR, Jogjahartono, Pujo Widodo. Pola sebaran kuman dan uji kepekaan antibiotika sekret telinga tengah penderita mastoiditis akut di RS Dr Kariadi Semarang 2004-2005. Cermin Dunia Kedokteran No. 155, 2007:77-80.

Losin K, et al. Pola kuman pada pasien otitis media kronis di RS Sardjito, Yogyakarta. Makalah Kongres Nasioanl PERHATI 1983.

[Wang EW](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20EW%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16301370), [Jung JY](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jung%20JY%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16301370), [Pashia ME](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pashia%20ME%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16301370), [Nason R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nason%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16301370), [Scholnick S](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Scholnick%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16301370), [Chole RA](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chole%20RA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16301370). Otopathogenic Pseudomonas aeruginosa strains as competent biofilm formers. [Arch Otolaryngol Head Neck Surg.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301370) 2005 Nov;131(11):983-9.