

Diterima: 2020-01-09

Doi:964

Disetujui: 2020-01-30

Publis

## Original artikel

MEDICINA ,Volume 51 Nomor 3 September 2020

e-ISSN:2540-8321 p-ISSN 2540-8313

### Variasi morfologi koloni *Burkholderia pseudomallei* pada media ashdown

**Santoso PNC, Budayanti NNS, Pinatih KJP**

Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Denpasar

Korespondensi:

Ni Nyoman Sri Budayanti

Departemen Mikrobiologi Klinik

Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah

Jl. Kesehatan 1, Denpasar 80114, Bali

Indonesia

E-mail: nyomansribudayanti@gmail.com

### Abstrak

*Burkholderia pseudomallei* merupakan bakteri yang menjadi penyebab melioidosis. Oleh CDC, bakteri ini dimasukkan sebagai “Category B” agent karena memiliki tingkat fatalitas yang tinggi serta sering meniru gejala penyakit lainnya. Bakteri ini memiliki ketahanan hidup yang tinggi serta dapat beradaptasi dengan lingkungan yang sulit. Salah satu adaptasi oleh bakteri ini adalah dalam perbedaan tipe koloni serta perubahan antar satu tipe ke tipe lainnya yang terjadi baik *in vivo* maupun *in vitro*. Pada penelitian ini ditemukan satu isolat bakteri gram negatif oxidase positif dari RSUP Sanglah di Bali yang menghasilkan tiga morfologi koloni di McConkey (MC). Pada penelitian ini, ditemukan bahwa ketiga tipe koloni tersebut merupakan koloni *B. pseudomallei* dengan morfologi yang berbeda menggunakan metode PCR, Kultur, dan Gram Staining. Ketiga koloni tersebut dipastikan sebagai *B. pseudomallei* saat dikonfirmasi menggunakan metode PCR. Selain itu, terlihat adanya perubahan morfologi koloni dari 3 tipe morfologi di McConkey menjadi 2 morfologi saat ditanam di media Ashdown (ASA). Kedua koloni di ASA tersebut memiliki morfologi *non-mucoid* dan *mucoid*. Pada pewarnaan Gram, *Burkholderia pseudomallei* dapat memberikan hasil pengecatan gram yang terlihat berbeda. Dibawah mikroskop, koloni dengan morfologi mucoid terlihat seperti bakteri batang gram negatif biasa sedangkan koloni dengan morfologi non-mucoid akan memperlihatkan “*Bipolar Staining*” yang khas dengan gambaran *Burkholderia pseudomallei*. Hal ini mengkonfirmasi bahwa *B. pseudomallei* dapat memiliki tipe morfologi koloni yang berbeda serta dapat merubah tipe morfologinya *in vivo*.

**Kata kunci:** Koloni *B. pseudomallei*, perubahan tipe koloni, Ashdown agar, kultur bakteri

## Abstract

*Burkholderia pseudomallei* is the causative agents of melioidosis. It is classified as “Category B” agent by the CDC due to the high fatality and it’s ability to mimics the symptoms of other diseases. This bacteria can survive and adapt in harsh environment and are resistant to various types of antibiotics. One of the adaptation that this bacteria have is the various types of colony morphologies and their ability to switch between types both *in vitro* and *in vivo*. One isolate of gram negative oxidase positive bacteria from Sanglah Hospital in Bali has been found to produce three types of colony morphology in McConkey media. It was confirmed by using PCR, Culture, and Gram Stain that those three different types of colonies were different types of colony morphologies that can be seen in *Burkholderia pseudomallei*. By using PCR, those three different types of colonies were identified as *Burkholderia pseudomallei*. Switching of colony morphology were also observed during subculturing from McConkey to Ashdown. From three different morphology in McConkey, only two different types of morphology found in Ashdown (muroid and non-muroid). Gram staining of those two types of colonies produce different bacterial morphology. Gram stain of muroid colonies can be observed as regular gram negative rod bacteria while gram stain of non-muroid colonies produce “bipolar staining” that are typical of *Burkholderia pseudomallei*. This showed that *B. pseudomallei* can exhibit different colony morphotypes and can undergo colony morphology switching *in vivo*.

**Keywords:** *B. pseudomallei*, Colony switching, Ashdown media, bacterial culture

## PENDAHULUAN

*Burkholderia pseudomallei* adalah bakteri *saprophyte* gram negatif yang dapat ditemukan di area Tropis dan Subtropis di Asia Tenggara dan Australia, dan merupakan penyebab melioidosis. Tanpa perawatan medis, melioidosis dapat berakibat fatal bagi 40% dari penderita, serta memiliki tingkat relapse yang tinggi.<sup>1</sup> Melioidosis memiliki gejala yang dapat menyerupai penyakit lain sehingga sering disebut sebagai “*The Great Mimicker*”.<sup>2</sup> *B. pseudomallei* resisten terhadap berbagai macam antibiotik dan memiliki ketahanan hidup yang tinggi. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofage sehingga menimbulkan periode laten yang panjang pada penderita melioidosis.<sup>3</sup>

*B. pseudomallei* memiliki 2 macam kromosome dan merupakan salah satu dari bakteri yang memiliki gen yang rumit serta memiliki tingkat mutasi yang tinggi baik *in vivo* maupun *in vitro*.<sup>4</sup> Bakteri ini merupakan bakteri *fastidious* dan dapat tumbuh di berbagai media. Pada umumnya, koloni *B. pseudomallei* tumbuh setelah 24 jam serta memiliki morfologi yang kering dan berkerut setelah 48 jam.<sup>5</sup> Akan tetapi, di 1930, dilaporkan akan adanya dua macam morfologi dari koloni *B. pseudomallei* yakni koloni dengan permukaan halus dan berkeriput.<sup>6,9</sup> Chantratita membagi morfologi dari *B. pseudomallei* menjadi 7 tipe berdasarkan bentuk dan warnanya.<sup>7,9,11</sup> Diketahui juga koloni *B. pseudomallei* dapat berubah tipe morfologinya dalam keadaan stress.<sup>7,9,12-13</sup> Selama ini, metode kultur merupakan “Gold Standard” dalam mengidentifikasi *B. pseudomallei*.<sup>2</sup> Adanya beberapa tipe morfologi koloni *B. pseudomallei* yang berbeda dapat menyulitkan bagi tenaga medis dalam mengidentifikasi isolat *Burkholderia pseudomallei* melalui metode kultur dan dapat menyebabkan misidentifikasi bakteri *B. pseudomallei* sehingga menyebabkan misdiagnosis dan penundaan penanganan medis yang tepat bagi penderita melioidosis.

Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini bertujuan untuk melihat adanya variasi morfologi bakteri *B. pseudomallei* yang terisolasi di laboratorium mikrobiologi klinik RSUP Sanglah. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Udayana dengan nomor 117/UN14.2.2.VII.14/LP/2019.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Subkultur Bakteri di Media Selektif Ashdown.**

Prosedur subkultur serta isolasi koloni dilakukan di dalam Biosafety Cabinet Level II untuk keselamatan peneliti. Selama masa penelitian yaitu dari Maret hingga Juni, terdapat 100 isolat bakteri dengan kriteria gram negatif oksidase positif yang dikumpulkan di RSUP Sanglah. Seluruh isolat tersebut disubkultur pada media McConkey (MC). Dari 100 isolat yang dikultur tersebut, terdapat satu isolat (nomor 67) yang menunjukkan 3 jenis morfologi koloni. Ketiga tipe koloni tersebut digunakan sebagai subyek dalam penelitian ini. Ketiga macam koloni tersebut antara lain: pink cerah bulat berukuran sedang (67A), pink muda dengan sisi tidak beraturan dan besar (67B), dan putih transparan dengan ukuran kecil (67C). Ketiga koloni yang berbeda tersebut selanjutnya masing-masing ditanam pada media Ashdown Agar (ASA) dan diinkubasi dengan suhu 37°C. Pengamatan perkembangan setiap isolat dilakukan pada hari ke 2, 3, dan 4.

**Pengecatan Gram.** Dari semua tipe isolat (67A, 67B, 67C), dilakukan pengecatan gram untuk melihat morfologi bakteri yang tumbuh di setiap koloni di media Ashdown. Hasil pengecatan diobservasi dan dibandingkan untuk melihat perbedaan setiap bakteri yang tumbuh di setiap isolat.

**Isolasi DNA dan Identifikasi Bakteri Menggunakan PCR.** Isolasi DNA dari dari isolat 67A, 67B, dan 67C dilakukan dengan menggunakan metode boiling. DNA yang didapat disimpan dalam suhu -20°C sebelum dilakukan proses PCR menggunakan primer yang menargetkan gen ORF2 TTSS1 yang spesifik pada *Burkholderia pseudomallei*.<sup>14</sup> Hasil PCR kemudian akan dikirim untuk disekuensing dan hasil sekuensing tersebut di BLAST untuk memastikan identitas dari bakteri.

## **HASIL**

**Hasil subkultur pada Ashdown.** Bentuk koloni dari hari ke hari dapat dilihat pada gambar 1. Isolat 67A dan 67B menghasilkan bentuk koloni *mucoïd* berwarna pink tua keunguan dengan pinggir rata yang tumbuh lebih cepat dibandingkan dengan isolat 67C. Isolat 67C memiliki morfologi koloni keriting (*non-mucoïd*) dengan ukuran sangat kecil yang menyerupai bunga *cornflower* berwarna ungu tua dengan kesan metalik. Isolat 67A dan 67B terlihat sudah hampir memenuhi permukaan media kultur pada hari ke 2 sedangkan isolat 67C tumbuh lebih lambat.

Di hari ke 3. Isolat 67A dan 67B tidak menunjukkan perkembangan signifikan selain dari memenuhi sedikit permukaan media yang masih tersisa. Isolat 67C menunjukkan perkembangan yang konstan dalam memenuhi permukaan media. Koloni yang tadinya hanya berupa titik kecil mulai berkembang dan semakin keriting.

Di hari ke 4. Isolat nomor 67A dan 67B tidak menunjukkan banyak perubahan pada ukuran maupun bentuk koloni. Isolat 67C menunjukkan perkembangan yang stabil dan koloni-koloni yang sebelumnya terlihat seperti titik sekarang membesar dan terlihat keriting. Pada

area yang padat terlihat sangat keriting sehingga menyerupai bunga *cornflower* berwarna ungu tua seperti dapat dilihat pada gambar 1.



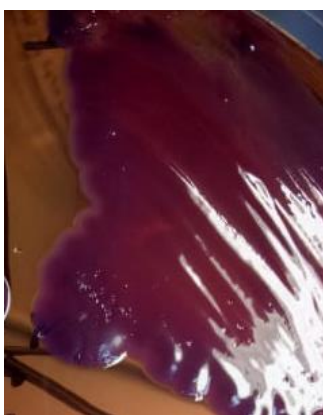
**A**



**B**



**C**



**E**



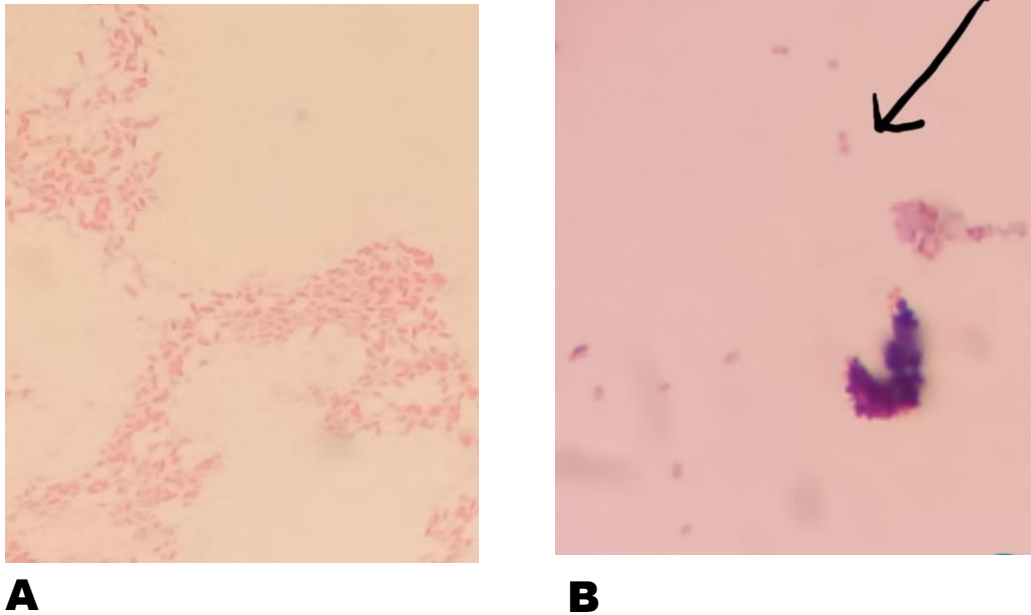
**F**



**G**

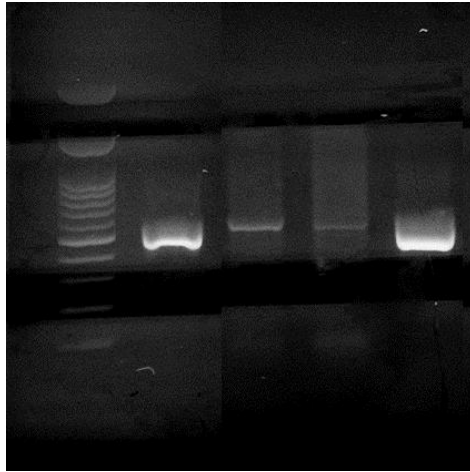
Gambar 1 – kultur isolat 67 pada MC menunjukkan tiga macam koloni sedangkan isolat 67A, 67B, dan 67C pada Ashdown agar menunjukkan dua tipe koloni. Isolat 67 dengan tiga jenis koloni seperti ditunjukkan dengan panah. Isolat 67A dan 67B menunjukkan koloni pink tua *mucoïd* sedangkan isolat 67C menunjukkan koloni ungu tua dengan morfologi keriting (*non-mucoïd*). Kultur isolat pada hari ke 2, 3, dan 4 (berurutan B, C dan D). Morfologi koloni isolat 67A, 67B, dan 67C pada hari ke 4 (berurutan E, F, dan G).

**Pengecatan gram koloni.** Pengecatan gram pada ketiga isolat menunjukkan bahwa isolat 67A dan 67B memiliki morfologi bakteri yang serupa yakni gram negatif dengan bentuk batang dengan ukuran kecil sedang isolat 67C menunjukkan bakteri berukuran kecil dengan bentuk seperti peniti yang sering disebut sebagai "*Bipolar Staining*". Hasil pengecatan gram dari ketiga isolat dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 – Pengecatan gram dari isolat dengan morfologi mucooid 67B menunjukkan bakteri gram negatif dengan morfologi batang (A). Gram staining dari isolat dengan morfologi keriting 67C menunjukkan bakteri gram negatif dengan "*Bipolar Staining*" seperti ditunjukkan pada panah (B).

**PCR gen ORF2 TTSS1.** Hasil PCR dari ketiga isolat menggunakan target gen ORF2 TTSS1 memberikan hasil positif bagi ketiga isolat dimana ketiganya memberikan hasil positif. Isolat 67A dan 67B menunjukkan satu pita yang tipis jika dibandingkan dengan isolat 67C seperti dilihat pada Gambar 2. Hasil sequencing dari isolat 67C telah di BLAST dan hasilnya mengkonfirmasi identitas isolat bakteri tersebut sebagai isolat *Burkholderia pseudomallei*. Hal ini mengkonfirmasi bahwa morfologi ketiga isolat 67A, 67B, dan 67C bukanlah kontaminasi dari bakteri lainnya.



Gambar 2 – Hasil PCR ketiga isolat 67A, 67B, dan 67C menargetkan gen ORF di TTSS1 memberikan hasil positif. Berurutan dari kiri: Marker (M), Control Positif (lane 1), 67A (lane 2), 67B (lane 3), dan 67C (lane 4). Isolat 67A dan 67B memberikan pita tipis sedangkan Isolat 67C memberikan pita yang tebal.

## DISKUSI

Perbedaan morfologi dan peralihan tipe koloni *Burkholderia pseudomallei* telah banyak dilaporkan di berbagai jurnal.<sup>3,6-7,9,13,15</sup> Berbagai tipe morfologi tersebut dibagi menjadi 7 tipe yakni Tipe I – VII.<sup>7,11</sup> Perubahan tipe koloni dari Tipe I ke tipe II dan III oleh karena stress lingkungan juga dilaporkan, dimana dalam keadaan stress Tipe I dapat berubah menjadi tipe II dan III.<sup>7,9</sup> Diduga perubahan tipe koloni akibat stress ini menyebabkan berubahnya 3 tipe morfologi koloni yang awalnya diamati pada MC berubah menjadi 2 tipe saat ditanam di media ASA. Identitas ketiga isolat tersebut telah dikonfirmasi sebagai *Burkholderia pseudomallei* menggunakan PCR yang menargetkan gen ORF2 TTSS1 yang spesifik bagi *B. pseudomallei* serta hasil sequencing dan BLAST. Menggunakan acuan jurnal dari Chantratita dan hasil PCR, diperkirakan isolat 67A dan 67B yang berwarna pink tua keunguan pada Ashdown dengan morfologi mucoid merupakan isolat *B. pseudomallei* morfologi tipe III, sedangkan isolat 67C yang berwarna ungu tua dengan morfologi kering serta keriting merupakan isolat *B. pseudomallei* morfologi tipe II.

Perbedaan morfologi dari koloni *B. pseudomallei* merupakan metode bakteri tersebut dalam beradaptasi dengan lingkungannya.<sup>7-13</sup> Koloni dengan morfologi mucoid tumbuh lebih cepat dan memiliki kesuksesan lebih tinggi dalam menginvasi dan berkembang di dalam macrofage namun mengalami stagnasi setelah memenuhi permukaan media *in vitro*. Koloni dengan morfologi non mucoid tumbuh lebih lambat namun dengan tingkat yang lebih stabil dan memiliki lethalitas yang lebih tinggi di dalam mencit.<sup>4,6,15</sup> Hal ini terlihat dimana isolat 67A dan 67B yang memiliki morfologi mucoid telah hampir memenuhi permukaan media pada hari ke 2 namun menunjukkan sedikit perkembangan di hari-hari selanjutnya. Isolat 67C yang memiliki morfologi non-mucoid tumbuh dengan lambat namun dalam tingkat perkembangan yang stabil.

Berdasarkan hasil gram stain, isolat 67A dan 67B menunjukkan bakteri gram negatif dengan bentuk batang yang normal sedangkan isolat 67C menunjukkan “*Bipolar Staining*” yang khas dengan bakteri *Burkholderia pseudomallei*.<sup>16</sup> Hasil gram stain pada penelitian ini menguatkan penelitian lain yang melaporkan isolat *B. pseudomallei* dengan morphotype mucoid menunjukkan hasil pewarnaan berupa gram negatif batang sedangkan isolat dengan morphotype non-mucoid menunjukkan hasil pewarnaan “*Bipolar Staining*”.<sup>15</sup>

Dalam penelitian ini, telah terkonfirmasi bahwa morfologi koloni yang berbeda dapat tumbuh dari satu isolat *Burkholderia pseudomallei*. Terlihat adanya perubahan morfologi koloni dari satu tipe ke tipe lainnya saat dihadapkan dengan lingkungan yang berbeda. Tergantung dari morfologi koloni, morfologi bakteri dapat terlihat berbeda dibawah mikroskop. Dengan teridentifikasinya ketiga tipe morfologi tersebut sebagai koloni *Burkholderia pseudomallei* menggunakan PCR, dapat dipastikan bahwa meskipun berbeda morfologi koloni dan hasil pengecatan gram, ketiga tipe koloni yang ditemukan pada isolat 67 memang benar merupakan koloni *B. pseudomallei*. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan bagi tenaga laboratorium medis dalam mengidentifikasi isolat *Burkholderia pseudomallei* dikarenakan kemungkinan adanya perbedaan morfologi koloni yang muncul bahkan dari satu isolat *B. pseudomallei* sekalipun.

Penelitian ini dapat memiliki kekurangan yakni keterbatasan keterampilan laborat dan tidak adanya kultur kontrol positif yang dapat digunakan dikarenakan belum pernah ditemukannya isolat *B. pseudomallei* di Bali dan sampel positif yang digunakan dalam PCR hanya berupa DNA sampel saja.

## **SIMPULAN DAN SARAN**

Metode identifikasi *B. pseudomallei* dengan metode kultur memiliki keterbatasan dikarenakan *B. pseudomallei* dapat memiliki beberapa tipe morfologi koloni yang berbeda sehingga menyulitkan bagi pekerja medis dalam mengidentifikasi *B. pseudomallei*. Salah satu isolat *B. pseudomallei* dari RSUP Sanglah dapat menunjukkan tiga tipe morfologi koloni saat ditanam di media MC yang kemudian berubah menjadi dua tipe koloni yang berbeda saat ditemukan di ASA yang merupakan media selektif bagi *B. pseudomallei*. Diharapkan melalui hasil penelitian ini, dapat dilakukan penelitian selanjutnya untuk melihat virulensi serta faktor-faktor yang dapat menyebabkan perubahan morfologi koloni dari isolat *B. pseudomallei* yang digunakan dalam penelitian ini.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. Wiersinga W, Currie B, Peacock S. Melioidosis. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(11):1035-1044.
2. Singh M, Mahmood M. Melioidosis: the great mimicker. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*. 2017;7(4):245-247.
3. Allwood E, Devenish R, Prescott M, Adler B, Boyce J. Strategies for Intracellular Survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Microbiology*. 2011;22(2):170



4. Amladi A, Devanga Ragupathi N, Vasudevan K, Venkatesan M, Anandan S, Veeraraghavan B. First report of *Burkholderia pseudomallei* ST412 and ST734 clones harbouring blaOXA-57 but susceptible to imipenem in India. *New Microbes and New Infections*. 2019;32:100613.
5. Hemarajata P, Baghdadi J, Hoffman R, Humphries R. *Burkholderia pseudomallei*: Challenges for the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016, 54 (12): 2866-2873.
6. Nicholls L. Melioidosis, With Special Reference To The Dissociation Of Bacillus Whitmori. *The British Journal Of Experimental Pathology*. 1930;XI(6):393-399.
7. Chantratita N, Wuthiekanun V, dkk. Biological Relevance of Colony Morphology and Phenotypic Switching by *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Bacteriology*. 2006;189(3):807-817.
8. Bernhards R, Cote C, Amemiya K, Waag D, Klimko C, Worsham P, dkk. Characterization of in vitro phenotypes of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* strains potentially associated with persistent infection in mice. *Archives of Microbiology*. 2016;199(2):277-301.
9. Wikraiphath C, Saiprom N, Tandhavanant S, *et al*. Colony Morphology Variation of *Burkholderia pseudomallei* Is Associated with Antigenic Variation and O-Polysaccharide Modification. *Infection and Immunity*. 2015;83(5):2127-2138.
10. Gierok P, Kohler C, Steinmetz I, Lalk M. *Burkholderia pseudomallei* Colony Morphotypes Show a Synchronized Metabolic Pattern after Acute Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(3):e0004483.
11. Koh S, Tay S, Puthuchear S. Colonial morphotypes and biofilm forming ability of *Burkholderia pseudomallei*. *Tropical Biomedicine*. 2013;30(3): 428–433
12. Price E, Sarovich D, Mayo M, dkk. Within-Host Evolution of *Burkholderia pseudomallei* over a Twelve-Year Chronic Carriage Infection. *mBio*. 2013;4(4): e00388-13. DOI: 10.1128/mBio.00388-13
13. Tandhavanant S, Thanwisai A, Limmathurotsakul D, dkk. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environments in human macrophages in vitro. *BMC Microbiology*. 2010;10(1):303.
14. Winstanley C, Hart C. Presence of Type III Secretion Genes in *Burkholderia pseudomallei* Correlates with Ara<sup>-</sup> Phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(2):883-885.
15. Shea A, Bernhards R, Cote C, dkk. Two stable variants of *Burkholderia pseudomallei* strain MSHR5848 express broadly divergent in vitro phenotypes associated with their virulence differences. *PLOS ONE*. 2017;12(2):e0171363.



16. Versalovic J. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia and Acidovorax. In: Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. Washington DC, ASM Press; 2011, h.692–713.