

## Aktivitas Antibiotik terhadap Biofilm *Staphylococcus aureus* Isolat Preputium Sapi Aceh

### *Antibiotic Activities to Staphylococcus aureus Biofilms of Aceh Cattle Preputium Isolate*

Maryulia Dewi<sup>1</sup>, Darmawi<sup>\*</sup>, Nurliana<sup>2</sup>, T. Fadrial Karmil<sup>2</sup>, T. Zahrial Helmi<sup>3</sup>, Fakhrurrazi<sup>1</sup>, Erina<sup>1</sup>, Mahdi Abrar<sup>1</sup>,  
M. Daud AK<sup>1</sup>, Masda Admi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>2</sup> Program Studi Magister Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Syiah Kuala

<sup>3</sup> Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

\*Email: [darmawi@unsyiah.ac.id](mailto:darmawi@unsyiah.ac.id)

Naskah diterima: 02 Mei 2018, direvisi: 18 Maret 2020, disetujui: 30 April 2020

#### Abstract

Biofilm is one of parameters for determining pathogenic pathways of a bacterium. Bacterial virulence activities can be attenuated by antibiotics with inhibiting biofilm. The aim of this study was to examine the characteristics and activities of antibiotics against the biofilm of *Staphylococcus aureus* isolate which taken from Aceh cattle prepuce. The study was exploratory and experimental, using a Completely Randomized Design (RAL) factorial pattern using three types of antibiotics, three concentrations and replications. Antibiotics were tetracycline, oxytetracycline and phosphomycin with concentrations of 10%, 20% and 30% (mg/mL), respectively. Therefore, the aim of this study was to examine the characteristics and activities of antibiotics to the biofilm of *Staphylococcus aureus* from Aceh cattle prepuce isolate. U-bottom polystyrene 96 wells microplate and Nutrient Broth (NB) medium was used to biofilm bacterial while biofilm was stained on crystals violet 1%. Optical Density (OD) of biofilm were  $\lambda$  595 nm. Data were analyzed by using Analysis of Variance (ANOVA). The results showed that the activity of *Staphylococcus aureus* was moderately positive, i.e 2,667cell/ $\mu$ L. It showed that antibiotics and concentrations have significant effect ( $P < 0.05$ ) to inhibit biofilm *staphylococcus aureus*. In addition, tetracycline 30% (mg / mL) has the best ability to inhibit biofilms from 52,18% to 1,262 cell/ $\mu$ L. Based on that fact, it can be concluded that the virulence of *Staphylococcus aureus* was moderate positive to be false positive.

**Key words:** Aceh cattle; antibiotics; biofilm; *Staphylococcus aureus*

#### Abstrak

Biofilm merupakan salah satu parameter untuk menentukan jalur patogenisitas suatu bakteri. Antibiotik dapat melemahkan aktivitas virulensi bakteri dengan menghambat pembentukan biofilm. Penelitian ini bertujuan untuk melihat karakteristik dan aktivitas antibiotik terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh. Penelitian bersifat eksplorasi dan eksperimental, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan menggunakan tiga jenis antibiotik, tiga konsentrasi dan tiga kali ulangan. Antibiotik yang digunakan adalah tetrasiklin, oksitetrasiklin dan fosfomisin dengan konsentrasi masing-masing 10%, 20% dan 30% (mg/mL). Pengujian biofilm dilakukan pada media *Nutrient Broth* (NB), menggunakan mikroplat *U-bottom polystyrene 96 wells*. Pewarnaan biofilm menggunakan kristal violet 1%. *Optical Density* (OD) biofilm dibaca pada  $\lambda$  595 nm. Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Hasil penelitian menunjukkan aktivitas virulensi *S. aureus* isolat preputium sapi Aceh berdasarkan karakteristik biofilm tergolong positif moderat, yaitu 2,667cell/ $\mu$ L. Uji biofilm menunjukkan jenis dan konsentrasi antibiotik

berpengaruh secara nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap daya hambat biofilm *S. aureus* isolat preputium sapi Aceh. Tetrasiklin 30% (mg/mL) mempunyai kemampuan paling baik menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh sebesar 52,18% menjadi 1,262 cell/ $\mu$ L, sehingga aktivitas virulensi *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh berdasarkan karakteristik biofilm dari positif moderat menjadi positif palsu.

**Kata kunci:** antibiotik; biofilm; sapi Aceh; *Staphylococcus aureus*

## Pendahuluan

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan subfertil dan infertilitas pada ternak sapi (Karmakar et al., 2016). Kejadian subfertil dan infertilitas pada sapi mengakibatkan penurunan populasi ternak terutama sapi Aceh yang sedang dikembangkan oleh pemerintah sebagai plasma nutfah daerah. *S. aureus* sering ditemukan pada preputium sapi (Ma'rufah, 2007). Bakteri ini dapat menginfeksi organ reproduksi jantan dan dapat mengkontaminasi semen sehingga terjadi penularan ke organ reproduksi betina pada saat perkawinan (Moretti et al., 2009). Infeksi *S. aureus* selanjutnya terjadi melalui vagina dan menerobos serviks sehingga mengkontaminasi uterus selama partus (Singh et al., 2008).

Faktor virulensi yang paling penting pada proses infeksi awal oleh *S. aureus* adalah adhesi yang memediasi perlekatan bakteri pada permukaan sel inang. Perlekatan bakteri yang diikuti dengan terjadinya kolonisasi akan memicu terbentuknya biofilm dan merupakan tanda mulai terjadinya patogenesis penyakit. Bakteri yang mempunyai kemampuan adhesi dan kolonisasi serta pertahanan terhadap fagositosis lebih bersifat virulen dari bakteri umumnya (Lestari dan Siti, 2015). Pembentukan biofilm menjadi salah satu penentu untuk mengidentifikasi galur patogenik suatu bakteri (Das dan Kapoor, 2004). Riddle (2001), menjelaskan pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus aureus* menyebabkan perubahan transkripsi gen dari sel planktonik menjadi sel bakteri yang resisten terhadap sistem imun inang karena antibodi tidak optimal dalam proses fagositosis dan eliminasi pertumbuhan sel, sehingga sel inang menjadi tempat penyebaran yang baik bagi *Staphylococcus aureus* untuk hidup dan berkembang. Infeksi yang ditimbulkan oleh pembentukan biofilm akhirnya menyebabkan resistensi terhadap antibiotik sehingga infeksi yang

ditimbulkan semakin sulit untuk disembuhkan. Gagalnya terapi antibiotik karena biofilm disebabkan oleh terhambatnya penetrasi antibiotik karena 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 (Homenta, 2016).

Antimikroba dapat menghambat pembentukan biofilm tergantung dari spesies bakteri dan jenis antimikroba yang digunakan, namun penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan terus menerus akan menyebabkan resistensi terhadap antibiotik. Pembentukan biofilm oleh jamur *Candida albicans* dapat diukur dengan teknik *crystal violet binding assay* (Lahkar et al., 2017). Teknik ini juga dapat digunakan untuk menilai kemampuan pembentukan biofilm oleh bakteri, terutama biofilm yang dibentuk oleh *Staphylococcus aureus*. Selama ini teknik *crystal violet binding assay* telah digunakan untuk melihat pembentukan biofilm pada alat-alat medis yang terkontaminasi *S. aureus* di Rumah Sakit. Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas antibiotik terhadap biofilm *S. aureus* isolat preputium sapi Aceh, sehingga dapat diperoleh antibiotik yang tepat untuk terapi pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* dan mencegah terjadinya resistensi antibiotik.

## Materi dan Metode

### Uji Antibakteri Antibiotik

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik dan media Nutrient Broth dengan merk Oxoid produksi Inggris. Sampel adalah *S. aureus* isolat sapi Aceh koleksi Laboratorium Mikrobiologi FKH Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. Uji dilakukan dengan metode mikrodilusi pada *microtiter plate U-bottom polystyrene 96 wells*. Pengujian di-

lakukan terhadap antibiotik tetrasiklin, oksitetrasiklin dan fosfomisin dengan konsentrasi masing-masing 10%, 20% dan 30% ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) dalam media Nutrient Broth (NB) dan suspensi bakteri dengan volume total 200  $\mu\text{L}$  tiap well. Sebelumnya *S. aureus* dikultur dalam NB dan dihitung kuantitas berdasarkan nilai *optical density* (OD). 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 selama 48 jam. Pembacaan nilai OD dilakukan menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595<sub>nm</sub> (Ardani *et al.*, 2010) di laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan, Unsyiah. Pengujian dilakukan secara triplo sebanyak tiga kali ulangan.

### Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Uji biofilm dilakukan dengan teknik *crystal violet binding assay* (Lahkar *et al.*, 2017), 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 tetrasiklin, oksitetrasiklin dan fosfomisin dengan konsentrasi 10%, 20% dan 30% ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) dalam media NB dan suspensi bakteri dengan volume total 200  $\mu\text{L}$  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 selama 42 jam. Setelah diinkubasi, isi mikroplat dikeluarkan dan dicuci dengan PBS. Mikroplat diberikan pewarna dengan cara dimasukkan 200  $\mu\text{L}$  larutan kristal violet 1% dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah mikroplat kering, sebanyak 200  $\mu\text{L}$  etanol 96% dimasukkan ke dalam mikroplat dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Mikroplat diukur menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595<sub>nm</sub> (Bjarnsholt *et al.*, 2011). Pengujian dilakukan secara triplo sebanyak tiga kali ulangan. Persentase penghambatan biofilm dihitung dengan menggunakan rumus modifikasi berikut (Nicolic *et al.*, 2014):

% Penghambatan Biofilm =

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

OD kontrol negatif = nilai OD bakteri tanpa antibiotik

OD sampel uji = nilai OD setelah perlakuan dengan antibiotik.

## Hasil dan Pembahasan

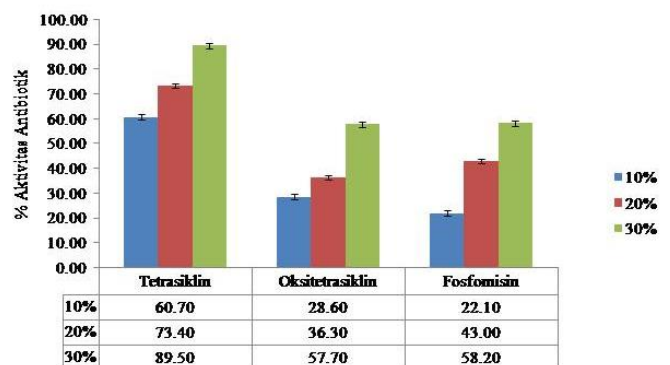
### Karakteristik Biofilm *S. aureus* Isolat Preputium Sapi Aceh

Kemampuan pembentukan biofilm *S. aureus* isolat preputium sapi Aceh adalah 2.667 cell/ $\mu\text{L}$ , hal ini menunjukkan bahwa aktivitas virulensi bakteri tersebut masuk dalam kategori positif moderat. Hasil ini merujuk pada karakteristik biofilm berdasarkan Lahkar *et al.* (2017), pembentukan biofilm metode *Cristal Violet Binding Assay* dengan nilai *optical density* 0 (+) berarti negatif, 1 (+) artinya positif palsu, 2 (+) positif moderat dan 3 (+) positif kuat.

### Aktivitas Antimikroba Antibiotik

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tetrasiklin mempunyai kemampuan paling baik sebagai antimikroba terhadap *S. aureus* karena mempunyai persentase paling tinggi dalam menghambat pembentukan biofilm, diikuti oleh fosfomisin dan oksitetrasiklin. Persentase aktivitas antibiotik terhadap daya antimikroba *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 1.

Persentase daya antimikroba dari Gambar 1 terlihat bahwa terjadi peningkatan daya antimikroba pada masing-masing antibiotik seiring dengan meningkatnya konsentrasi. Hasil tertinggi terdapat pada aktivitas tetrasiklin 30% yaitu sebesar 89,50% dan terendah pada oksitetrasiklin konsentrasi 10% yaitu sebesar 28,60%.



Gambar 1. Aktivitas daya antimikroba antibiotik tetrasiklin, oksitetrasiklin, dan fosfomisin terhadap *S. aureus*

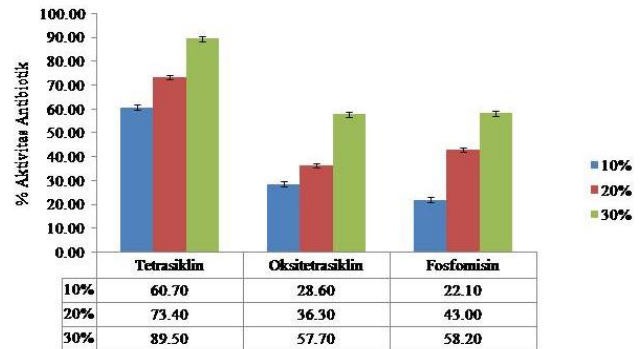
uji ANOVA menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap daya antimikroba *S. aureus* berdasarkan jenis antibiotik berbeda secara nyata ( $p < 0,05$ ) antar perlakuan. Selanjutnya hasil uji Duncan menunjukkan aktivitas antimikroba tetrasiklin berbeda dengan aktivitas fosfomisin dan oksitetrasiklin. Namun aktivitas antimikroba fosfomisin sama dengan oksitetrasiklin. Berdasarkan konsentrasi juga berbeda secara nyata ( $p < 0,05$ ) antar konsentrasi. Selanjutnya hasil uji Duncan menunjukkan perlakuan konsentrasi 10% berbeda dengan konsentrasi 20% dan konsentrasi 30%.

Tetrasiklin dan fosfomisin merupakan antibiotik spektrum luas baik terhadap Gram positif maupun Gram negatif, oleh karena itu daya antimikrobanya paling tinggi dibanding oksitetrasiklin yang merupakan turunan dari tetrasiklin. Ketiga antibiotik tersebut termasuk jenis antibiotik yang hanya dapat menghambat pertumbuhan kuman (bakteriostatik). Tetrasiklin dan oksitetrasiklin bekerja pada ribosom bakteri dengan cara menghambat kodon-antikodon antara mRNA dengan tRNA, sedangkan fosfomisin mengganggu biosintesis dinding sel bakteri (Sader *et al.*, 2009). Menurut Choon *et al.* (2017), fosfomisin masuk ke dalam sel bakteri melewati mekanisme transport aktif, setelah berikatan dengan reseptor, ikatan oksigen terbuka membentuk intermediet reaktif yang akan meng-alkilasi situs aktif enzim fosfoenolpiruvat transferase bakteri, akibatnya biosintesa dinding sel polimer peptidoglikan yaitu asetil muramat pentapeptida terhenti.

Aktivitas oksitetrasiklin sebagai antimikroba *S. aureus* isolat preputium sapi Aceh menunjukkan persentase yang rendah. Hasil 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.

### Aktivitas Antibiotik terhadap Biofilm *S. aureus*

Persentase aktivitas antibiotik terhadap daya hambat biofilm *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas antibiotik tetrasiklin, oksitetrasiklin, dan fosfomisin terhadap penghambatan biofilm *S. aureus*

Persentase daya hambat biofilm dari Gambar 2 terlihat bahwa terjadi peningkatan daya hambat biofilm pada masing-masing antibiotik seiring meningkatnya konsentrasi. Hasil tertinggi terdapat pada aktivitas tetrasiklin 30% yaitu sebesar 52,18% dan terendah pada oksitetrasiklin konsentrasi 10% yaitu sebesar 2,20%. Hasil uji ANOVA menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap daya hambat biofilm *S. aureus* berdasarkan jenis antibiotik berbeda secara nyata ( $p < 0,05$ ) antar perlakuan. Selanjutnya hasil uji Duncan menunjukkan aktivitas antimikroba tetrasiklin berbeda dengan aktivitas fosfomisin dan oksitetrasiklin. Berdasarkan konsentrasi juga berbeda secara nyata ( $p < 0,05$ ) antar konsentrasi. Selanjutnya hasil uji Duncan menunjukkan perlakuan konsentrasi 10% berbeda dengan konsentrasi 20% dan konsentrasi 30%.

Daya hambat biofilm *S. aureus* oleh antibiotik tetrasiklin dan fosfomisin lebih baik dari pada oksitetrasiklin, hal ini sesuai dengan penelitian Merle *et al.* (2002), yang menyatakan bahwa *S. aureus* dalam bentuk biofilm bersifat resisten terhadap oksitetrasiklin. Oksitetrasiklin juga mempunyai daya antimikroba yang terendah dari daya antimikroba tetrasiklin walaupun tidak jauh berbeda dengan daya antimikroba fosfomisin, dapat lihat pada Gambar 1. Hal ini menunjukkan bahwa oksitetrasiklin hanya bersifat sebagai antimikroba tapi tidak sebagai antibiofilm. Terapi pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* dengan antibiotik dalam bentuk biofilm lebih sulit dari pada dalam bentuk sel planktoniknya, karena bakteri membentuk biofilm sebagai mekanisme pertahanannya (Bjarnsholt *et al.*, 2011). Bakteri di dalam biofilm lebih resisten 10-1.000 kali

dibandingkan bila tidak di dalam biofilm (Monroe, 2007). Menurut Hoiby *et al.* (2011), biofilm yang dibentuk oleh bakteri membuat antibiotik mampu berdifusi menembus struktur campuran eksopolisakarida, DNA, dan protein untuk mencapai target namun tidak mencapai konsentrasi efektif disemua bagian. Namun secara keseluruhan menurut Sarah *et al.* (2017), pengobatan dengan terapi antibiotik pada infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* lebih dipengaruhi oleh biofilm yang dibentuk multispecies. Biofilm yang dibentuk oleh bakteri multispecies akan menyebabkan penyakit infeksi semakin sulit untuk disembuhkan.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas virulensi *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh berdasarkan karakteristik biofilm tergolong positif moderat, yaitu 2,667 cell/ $\mu$ L. Aktivitas antibiotik dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh. Tetrasiklin 30% (mg/mL) mempunyai kemampuan paling baik menghambat pembentukan biofilm sebesar 52,18% menjadi 1,262 cell/ $\mu$ L, sehingga aktivitas virulensi *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh menjadi lemah atau tergolong positif palsu.

### Daftar Pustaka

- Ardani, M., Sylvia, U.T.P., dan Triana, H. (2010). Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai anti plak gigi. *Farmasi Indonesia*, 21 (3): 191–201.
- Bjarnsholt, Th., Jensen, P.O., Moser, C., and Hoiby, N. (2011). *Biofilm Infections*. Springer-Verlag. New York: 1014.
- Choon, K. K., Catarina, M., Hermínia, L., and Alexander, T. (2017). Antibiotic resistance as a stress response: Recovery of high-level oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* “auxiliary” (*fem*) mutants by Induction of the stringent stress response. *J. Antimicrob Chemother.* 61 (8): e00313-17.
- Das, S.C. and K.N. Kapoor. (2004). Effect of growth medium on hydrophobicity of *Staphylococcus epidermidis*. *Indian J. Med. Res.* (119): 107 – 109.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Giuskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. 2011. Antibiotic resistance of bacterial biofilm. *J. Antimicrobial Agents* 34 (4): 322-325.
- Homenta, H. (2016). Infeksi biofilm bakterial. *J. e-Biomedik* 1 (4): 1-11.
- Karmakar, A., Dua, P., and Ghosh, C. (2016). Biochemical and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from hospitalized patients. Hindawi Publishing Corporation. *Canadian J. Infectious Diseases and Medical Microbiology.* (1): 1-7.
- Lahkar, V., Saika, L., Saura, J.P., Nath, R., and Das, P.P. (2017). Estimation of biofilm, proteinase dan phospholipase production of the *Candida* species isolated from the oropharyngeal samples in HIV-infected patients. *Indian J. Med. Res* (145): 635-640.
- Lestari, F. B., dan Siti, I.O.S. (2015). Karakterisasi *Staphylococcus aureus* isolat susu sapi perah berdasarkan keberadaan protein-A pada media serum soft agar terhadap aktivitas fagositosis secara invitro. *JSV* 33 (20): 149-155.
- Ma'rufah, (2007). Keanekaragaman bakteri yang terdapat dalam preputium pejantan sapi unggul di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang. *Skripsi*. Universitas Negeri Malang.
- Merle, E. O., Ceri, H., Douglas, W., Morck, A.G., Buret, and Read, R.R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Canadian J. Veterinary Res.* 66(2): 86–92.
- Monroe, D. (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *J. PLoS Biol.* 5(11): 307.
- Moretti, E., Capitani, S., Figura, N., Pammolli, A., Federico, M.G., Giannerini, V., and Collodel, G. (2009). The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J. Assist Reprod Genet.* 26 (1): 47–56.

- Nicolic, M., Vasic, S., Durdevic, J., Stevanovic, O., and Comic, L. (2014). Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale* (Roscoe)) ethanolic extract. Laboratory of Microbiology, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac. *Kragujevac J. Sci.* (36) 129-136.
- Prawesthirini, S., Ferianto, A., dan Supranianondo, K. (2012). Pola resistensi *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari mastitis pada sapi perah di wilayah kerja KUD Argopuro Krucil Probolinggo terhadap antibiotika. *J. Vet Medika.* 5 (3): 181-186.
- Riddle, L. K. (2001). Of biofilm resistance antimicroba agents chemotherapy. *J. Med Microbiol.* (45): 999-1007.
- 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., and 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 Chemother.* 53(10): 4127-32.
- Sarah, T., Aurélie, C., Mayram, H., Liesbeth, S., Silke, H., Petra, R., Inne, D., and Tom, C. (2017). Community composition determines activity of antibiotics against multispecies biofilms. *J. Antimicrob Chemother.* 61(9): e00302-17.
- Singh, J., Murray, R.D., Mshelia, G., and Woldehiwet, Z. (2008). The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *The Veterinary Journal* 175 (3) : 301-309.