

UJI AKTIVITAS BAKTERIOFAGE LITIK DARI LIMBAH RUMAH TANGGA TERHADAP *Salmonella Typhi*

Yoga Dwi Jatmiko*¹, Agung Putra Purwanto², Tri Ardyati³

^{1,2,3}Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65145

e-mail: *¹jatmiko_yd@ub.ac.id; ²putra.agung20@gmail.com; ³tri_ardiyati@yahoo.com

Diterima :30 Oktober
2018

Disetujui : 18 November
2018

e-ISSN : 2541-4208
p-ISSN : 2548-1606

DOI: 10.15575/biodjati.v3i2.3471

Abstrak. *Salmonella Typhi* merupakan salah satu bakteri yang menjadi agen penyakit bawaan makanan. Bakteriofage sebagai alternatif penggunaan antibiotika telah digunakan untuk mengendalikan bakteri tersebut. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteriofage litik yang mampu melisis beberapa bakteri patogen yang diujikan dan mengetahui pengaruh aktivitas bakteriofage litik terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi*. Bakteriofage diisolasi dari limbah rumah tangga (air selokan, air sungai dan septic tank). Selanjutnya penentuan host range bakteriofage terhadap bakteri patogen lain dilakukan dengan metode spot test. Uji aktivitas bakteriofage terhadap *Salmonella Typhi* dilakukan menggunakan metode bacterial challenge test. Berdasarkan hasil isolasi, didapat enam isolat bakteriofage, yaitu B2-St, B3-St, S1-St, S2-St, SL1-St, dan SL3-St. Semua isolat bakteriofage mampu melisis sel bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella Typhimurium* namun tidak mampu melisis *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. Tiga isolat bakteriofage telah terpilih berdasarkan densitas plaque terbanyak yaitu B2-St, SL3-St dan S2-St. Kemampuan isolat bakteriofage B2-St dalam melisis sel *Salmonella Typhi* lebih tinggi ($6,81 \pm 0,35 \log \text{ sel/mL}$) daripada isolat bakteriofage SL3-St ($7,39 \pm 0,31 \log \text{ sel/mL}$) dan S2-St ($7,60 \pm 0,27 \log \text{ sel/mL}$). Penurunan densitas sel inang terendah oleh ketiga isolat bakteriofage terjadi pada jam ke-4. Bakteriofage B2-St merupakan bakteriofage terbaik dan berpotensi sebagai agen biokontrol *Salmonella Typhi*.

Kata kunci: bakteriofage litik, limbah rumah tangga, *Salmonella Typhi*

Abstract. *Salmonella Typhi* is considered to be the one of important pathogenic bacteria that can cause food-borne diseases. The use of bacteriophage for controlling this pathogenic bacterium has been proposed to substitute the use of antibiotics. The objectives of research were to obtain lytic bacteriophage that capable to inhibit some tested pathogenic bacteria and to determine the activity of isolated lytic bacteriophage against the growth of *Salmonella Typhi*. Bacteriophages were isolated from household wastes (sewage, river, and septic tank). The spot test method has been applied for host range assay towards selected pathogenic bacteria. Bacteriophage activity test towards *Salmonella Typhi* has been performed by using bacterial challenge test method. The result of this research was six bacteriophages have been successfully isolated by using double layer method, namely B2-St, B3-St, S1-St, S2-St, SL1-St, and SL3-

St. They were able to inhibit the growth of both Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, shown by plaque forming. Three bacteriophage isolates were selected based on their plaque density, namely B2-St, SL3-St and S2-St. Moreover, the activity of bacteriophage B2-St was the highest in inhibiting the Salmonella Typhi growth ($6.81 \pm 0,35$ log cells/mL) compared to bacteriophage SL3-St ($7.39 \pm 0,31$ log cells/mL) and S2-St ($7.60 \pm 0,27$ log cells/mL). The lowest density of Salmonella Typhi has been achieved after each three isolates of bacteriophage were incubated for four hours. Bacteriophage B2-St was potentially to be applied as biocontrol agent against Salmonella Typhi.

Keywords: lytic bacteriophage, domestic wastewater, Salmonella Typhi

Cara Sitasi

Jatmiko, Y. D., Purwanto, A. P. & Ardyati, T. (2018). Uji Aktivitas Bakteriofage Litik dari Limbah Rumah Tangga terhadap *Salmonella Typhi*. *Jurnal Biodjati*, 3 (2), 134-147-.

PENDAHULUAN

Insiden penyakit infeksi oleh mikroba melalui makanan masih sering terjadi di banyak negara. Menurut data administrasi makanan dan obat (FDA) Amerika Serikat, penyakit asal pangan yang disebabkan oleh kontaminasi mikroba menempati urutan pertama di antara racun alami, residu pestisida, dan bahan tambahan pangan (Winarti & Miskiyah, 2010). Data rangkuman kasus keracunan pangan dari Direktorat Surveilan dan Penyuluhan Keamanan pangan, BPOM tahun 2001-2004 menyatakan bahwa penyebab keracunan akibat mikroba patogen menempati urutan pertama dan selanjutnya diikuti oleh akibat senyawa kimia, dan racun alami. Data penyebab keracunan akibat mikroba patogen tersebut adalah sebagai berikut, jumlah kasus tahun 2001 terdapat enam kasus, tahun 2002 terdapat 12 kasus, tahun 2003 terdapat sembilan kasus dan tahun 2004 terdapat 21 kasus (Hariyadi, 2008). Departemen Pertanian Amerika Serikat (USDA) tahun 1996 memperkirakan terjadi 4000 kematian dari lima juta penderita setiap tahunnya sebagai akibat mengonsumsi produk-produk daging yang tercemar empat jenis bakteri patogen

yaitu *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 dan *Listeria monocytogenes*.

Perhatian khusus terhadap beberapa bakteri patogen, terutama *Salmonella* sp. perlu dilakukan karena merupakan agen penyakit bawaan makanan. Salmonellosis terjadi apabila bakteri *Salmonella* serovar Typhi dan Paratyphi A, B, dan C yang hanya menginfeksi manusia masuk ke dalam tubuh melalui makanan atau minuman yang telah terkontaminasi (Andriani & Kurniawati, 2007). *Salmonella* dapat tumbuh dan memproduksi endotoksin yang dapat menyebabkan salmonellosis yang ditandai dengan adanya gejala gastroenteritis seperti sakit perut, mual dan diare, kadang disertai demam ringan dan sakit kepala (Mahamuni et al, 2017). *Salmonella* menyerang mukosa usus (saluran pencernaan), jaringan limfoid dan diteruskan ke kelenjar getah bening sehingga dapat menyebabkan gastroenteritis dan tifus (Wray, 2003).

Pengobatan infeksi *Salmonella Typhi* biasanya digunakan beberapa antibiotika seperti ampicillin, chloramphenicol dan trimethoprim – sulfamethoxazole. Namun, *Salmonella Typhi* telah menjadi resisten pada salah satu atau lebih dari satu antibiotika tersebut (Eng et al, 2015). Selain itu,

penggunaan antibiotika dapat meninggalkan residu dalam bahan pangan yang sering ditemukan pada produk hasil peternakan (Sonderholm, 2008). Salah satu alternatif pengendalian *Salmonella* Typhi yang relatif aman adalah penggunaan bakteriofage. Bakteriofage merupakan virus yang menginfeksi dan bereplikasi dalam sel prokariotik. Bakteriofage tipe litik menginfeksi sel bakteri dengan berlipat ganda sampai bakteri lisis dan terbentuk bakteriofage baru. Umumnya bakteriofage bekerja secara spesifik pada spesies bakteri tertentu (Filho et al, 2007). Bakteri *Salmonella* Typhi umumnya hidup di lingkungan yang kotor misalnya limbah rumah tangga, hal ini dapat diindikasikan bahwa untuk mencari musuh alaminya terutama virus atau fage juga dapat diisolasi dari *Salmonella* Typhi tersebut berkembang biak. Menurut Kutter & Sulakvelidze (2005), bakteriofage tumbuh dan berkembang biak di dalam bakteri, sehingga apabila di suatu lingkungan diduga terdapat bakteri tertentu dalam jumlah besar maka bakteriofage dipastikan berada di lingkungan tersebut.

Secara umum bakteriofage memiliki peluang untuk digunakan sebagai alternatif pengontrolan bakteri (Sillankorva et al, 2012). Bakteriofage litik memiliki kemampuan menurunkan jumlah kontaminasi *Salmonella* dan *Campylobacter*, terutama untuk mengontrol *Salmonella* pada produk ternak ayam secara signifikan (Huff et al, 2005; Bao et al, 2015). Penggunaan bakteriofage juga dilakukan pada organisme hidup untuk terapi kesehatan pada pengendalian bakteri patogen yang terdapat di dalam saluran pencernaan hewan ternak. Kajian pada bidang pertanian, bakteriofage diaplikasikan sebagai agen pengendalian bakteri patogen pada tanaman (Strauch et al, 2007). Infeksi *Salmonella* Typhi menyebabkan penyakit tifus pada manusia. Hal ini disebabkan oleh agen perantara seperti air

minum atau makanan yang terkontaminasi oleh *Salmonella* Typhi dan perilaku higienis yang kurang memadai (Wray, 2003). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteriofage litik yang mampu melisiskan beberapa bakteri patogen yang diujikan dan mengetahui pengaruh aktivitas bakteriofage litik terhadap pertumbuhan *Salmonella* Typhi.

Kultur Bakteri

Kultur bakteri yang digunakan sebagai inang untuk isolasi bakteriofage adalah *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella* Typhi) dan *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium). Isolat yang digunakan untuk penentuan *host range* terdiri dari *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Salmonella* Typhimurium yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

Isolasi Bakteriofage

Bakteriofage diisolasi dari limbah rumah tangga, dalam hal ini adalah air selokan, air sungai (DAS Brantas) dan *septic tank*. Pengambilan sampel limbah rumah tangga dilakukan sebanyak dua kali pada tempat yang berbeda di wilayah kota Malang dan sekitarnya. Sampel tersebut diambil dan dimasukkan dalam botol steril kemudian langsung dibawa ke laboratorium untuk segera dianalisis.

Setiap jenis limbah rumah tangga (air selokan, air sungai, dan *septic tank*) sebanyak 50 mL disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm, pada suhu 25 °C selama 20 menit untuk mendapatkan supernatan. Supernatan sebanyak 20 mL ditambahkan tryptic soy broth (TSB) 10 mL dalam botol kultur 100 mL dan kedua kultur *Salmonella* (*Salmonella* Typhi

dan *Salmonella* Typhimurium) masing-masing sebanyak 5 mL secara aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kedua kultur *Salmonella* tersebut sebelumnya telah diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam yang diperkirakan telah mencapai awal fase log (Kocharunchitt et al, 2008). Setelah diinkubasi, suspensi dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi sebanyak 15 mL untuk dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, pada suhu 25 °C selama 10 menit sebanyak tiga kali secara berurutan. Bagian supernatan diambil dan disaring menggunakan membran filter dengan diameter pori 0,45 µm sehingga didapatkan filtrat bakteriofage (O'Flynn et al, 2004).

Deteksi keberadaan bakteriofage dalam sampel dilakukan menggunakan metode double-layer (Kocharanchitt et al, 2008). Media tryptic soy agar (TSA) 10 mL disiapkan pada cawan Petri sebagai agar base. Kultur *Salmonella* awal fase log masing-masing sebanyak 200 µL diinokulasikan ke dalam 4 mL TSA 0,6% yang berbeda, dan dihomogenasi dengan cara dibolak-balik secara perlahan. Kemudian filtrat bakteriofage sebanyak 200 µL disuspensikan juga ke dalam 4 mL TSA 0,6% secara aseptis dan dihomogenasi secara perlahan. Kultur tanpa filtrat bakteriofage digunakan sebagai kontrol. Uji ini dilakukan secara duplo. Suspensi dalam media TSA 0,6% tersebut dituang di atas *agar base* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Terbentuknya *plaque* atau zona bening menandakan adanya suatu aktivitas lisis oleh bakteriofage.

Pembuatan Stok Bakteriofage

Plaque atau zona bening pada *top layer agar* diambil dengan menggunakan dryglasky dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang mengandung buffer SM (*salt of magnesium*) sebanyak 10 mL dan kloroform

sebanyak dua tetes. Penambahan kloroform berfungsi untuk melisiskan sel inang yang tersisa agar fage dapat dikeluarkan. Kemudian suspensi dihomogenasi secara perlahan dan disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 25 °C selama 10 menit untuk memisahkan suspensi bakteriofage. Bagian supernatan diambil dan disaring menggunakan membran filter dengan diameter pori 0,45 µm sehingga didapatkan stok bakteriofage (O'Flynn et al, 2004). Stok bakteriofage disimpan di dalam refrigerator.

Uji Konfirmasi dan Penentuan *Host Range* Bakteriofage

Keberhasilan isolasi bakteriofage dikonfirmasi dengan metode *spot test* (Clokie & Kropinski, 2009). Kultur *Salmonella* Typhi awal fase log dalam media TSB digoreskan pada media TSA menggunakan *cotton bud* steril dan dibiarkan mengering pada suhu ruang selama dua jam. Stok bakteriofage diambil satu ose dan diinokulasikan pada media TSA yang telah terdapat kultur *Salmonella* Typhi. Suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati terbentuknya *plaque* atau zona bening.

Penentuan *host range* (kisaran inang) bakteriofage dilakukan pada kultur selain *Salmonella* Typhi yaitu *E. coli*, *Sh. dysenteriae*, *St. aureus*, *B. cereus* dan *Salmonella* Typhimurium dengan metode *spot test* (Clokie & Kropinski, 2009). Isolat bakteriofage yang diujikan adalah semua isolat yang berhasil dikonfirmasi melalui uji konfirmasi sebelumnya. Kultur sel inang disiapkan sampai mencapai awal fase log dalam media TSB. Tiap kultur diambil 2 mL dan digoreskan menggunakan *cotton bud* steril pada permukaan media TSA secara merata dan dibiarkan mengering pada suhu ruang selama dua jam. Stok bakteriofage diambil satu ose dan diinokulasikan pada media TSA tersebut

Kemudian media TSA tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Terbentuknya *plaque* atau zona bening diamati.

Penentuan Densitas Bakteriofage

Penentuan densitas bakteriofage menggunakan metode pengenceran bertingkat menurut Prescott (2002) dengan sedikit modifikasi. Stok bakteriofage sebanyak 0,1 mL ditambahkan ke dalam garam fisiologis 0,85% sebanyak 0,9 mL (sampai pengenceran 10⁻⁶). Kemudian dari setiap tahap pengenceran (10⁻¹ s.d 10⁻⁶) bakteriofage diambil 200 µl untuk ditambahkan ke dalam 4 mL TSA 0,6% yang mengandung kultur *Salmonella* Typhi awal fase log sebanyak 200 µl dan dihomogeni. Kemudian suspensi dituang ke dalam cawan Petri berbeda yang telah berisi TSA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. *Plaque* yang terbentuk pada cawan petri yang memenuhi syarat (kisaran 25-250 *plaque*) diamati dan dihitung menggunakan rumus 1 dalam satuan PFU/mL (*Plaque Forming Unit*/mL). Berikutnya, stok bakteriofage diencerkan menggunakan buffer SM jika densitas yang diharapkan lebih sedikit.

$$\text{Total plaque} = \frac{\text{jumlah plaque}}{\text{faktor pengenceran}} \quad (1)$$

Uji Aktivitas Penghambatan Bakteriofage Litik terhadap Pertumbuhan *Salmonella* Typhi

Uji aktivitas bakteriofage terhadap *Salmonella* Typhi menggunakan metode *Bacterial Challenge Test* (O'Flynn et al, 2004). Kultur *Salmonella* Typhi sebanyak 15 mL diinokulasikan ke dalam 150 mL media TSB diinkubasi pada suhu 37°C sampai mencapai densitas sel sebanyak 10⁶ sel/mL. Setelah diinkubasi, kultur *Salmonella* Typhi dalam media TSB dibagi ke beberapa Erlenmeyer

(tergantung jumlah isolat bakteriofage yang diperoleh) dengan volume 50 mL. Bakteriofage ditambahkan dalam inokulum *Salmonella* Typhi dengan volume berdasarkan nilai *multiplicity of infection* (MOI) sebesar 50. MOI adalah perbandingan antara jumlah bakteriofage dan bakteri uji (Stephenson, 2003). Kultur *Salmonella* Typhi yang telah ditambahkan bakteriofage diinkubasi pada suhu 37 °C dalam kondisi yang sama selama 12 jam. Densitas sel *Salmonella* Typhi ditentukan dengan mengukur nilai kerapatan optik (λ: 600 nm) pada jam ke- 0,1, 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 dan 12. Kontrol yang digunakan pada uji aktivitas ini adalah kultur *Salmonella* Typhi tanpa bakteriofage.

Analisis Data

Pengaruh jenis fage dan lama waktu inkubasi terhadap penurunan jumlah *Salmonella* Typhi dianalisis secara kuantitatif menggunakan analisis *One-Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *Tukey* dan *Games Howell* pada selang kepercayaan 95%. Analisis statistik data tersebut dilakukan menggunakan *SPSS 22 for Windows*.

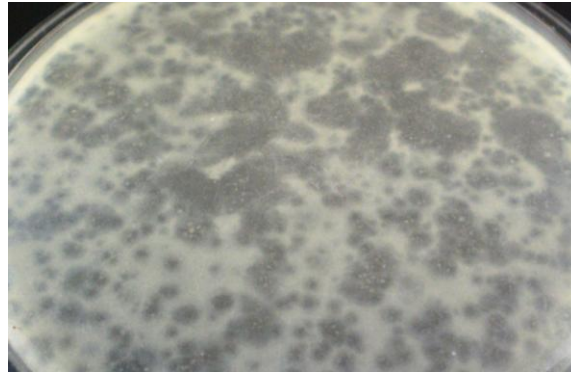
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteriofage

Enam isolat bakteriofage yang dapat menginfeksi dan melisis *Salmonella* khususnya *Salmonella* Typhi telah berhasil diisolasi dari tempat pengambilan sampel (Tabel 1) ditandai terbentuknya *plaque* atau zona bening. *Plaque* yang terbentuk memiliki karakter yang hampir sama, antara lain berbentuk bulat kecil (diameter ± 0,1 mm), merata di seluruh permukaan media namun beberapa berada di bagian tepi dari media (Gambar 1). Ukuran *plaque* dengan diameter besar bisa mencapai 3 mm (Kanjana, 2007). Jumlah dan ukuran *plaque* yang terbentuk

dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya jenis fage, suhu, jumlah bakteri inang, pH, ion-ion, dan cahaya seperti ultraviolet (Grabow, 2001). Isolat-isolat bakteriofage kemudian diperbanyak untuk stok dan selanjutnya stok

bakteriofage tersebut dikonfirmasi dengan menggunakan metode *spot test*. Hasil uji konfirmasi stok bakteriofage menunjukkan terbentuknya *plaque* pada biakan *Salmonella Typhi* di cawan Petri (Tabel 1).



Gambar 1. Hasil *overlay* bakteriofage (isolat B3-St) yang menginfeksi *Salmonella Typhi*

Tabel 1. Isolasi dan konfirmasi stok bakteriofage terhadap *Salmonella Typhi*

No	Sumber	Kode Isolat	Pembentukan <i>Plaque</i>	
			Isolasi	Stok
1	Sungai Brantas	B2St	+	+
		B3St	+	+
2	Septic Tank	S1St	+	+
		S2St	+	+
3	Air Selokan	SL1St	+	+
		SL3St	+	+

Keterangan. + : terbentuk *plaque*

Host Range Bakteriofage

Uji *host range* semua isolat bakteriofage menunjukkan bahwa selain mampu melisis *Salmonella Typhi*, keenam isolat bakteriofage tersebut juga mampu melisis sel *Salmonella Typhimurium* dan *E. coli* yang ditandai dengan terbentuknya *plaque* (Tabel 2).

Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteriofage yang diperoleh memiliki kisaran inang yang luas. *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella* merupakan anggota kelompok Enterobacteriaceae. Namun dalam uji *host range*, isolat bakteriofage yang didapat tidak mampu melisis *Sh. dysenteriae*. Hal ini berkaitan dengan perbedaan molekul reseptor

inang dan berkaitan dengan aktivitas DNA metilase sehingga *Sh. dysenteriae* lebih resisten terhadap virus. Jenis reseptor pada *Sh. dysenteriae* yang dikenali oleh bakteriofage adalah polisakarida-O (Silva et al, 2016). Beberapa faktor yang menyebabkan fage tidak dapat menginfeksi strain bakteri lain adalah berkaitan dengan variasi atau perbedaan molekul reseptor sel inang (*adsorption blocking*), sistem modifikasi restriksi sel inang, serta sistem resisten terhadap fage seperti kegagalan dalam menginfeksi sel inang (O’Flynn et al, 2004).

Tabel 2. Uji *host range* bakteriofage terhadap beberapa bakteri patogen

No	Isolat	Host				
		<i>B. cereus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Sh. disenteriae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
1	B2-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	B3-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
2	S1-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	S2-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
3	SL1-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	SL3-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)

Keterangan: (+) : terbentuk *plaque*
 (-) : tidak terbentuk *plaque*

Densitas Bakteriofage

Densitas isolat bakteriofage tertinggi adalah S2-St ($1,20 \times 10^{10}$ PFU/mL) sedangkan yang terendah adalah SL1-St ($8,10 \times 10^6$ PFU/mL) (Tabel 3). Densitas bakteriofage yang berasal dari *septic tank* (S1-St dan S2-St) lebih tinggi dari sumber air selokan (SL1-St dan SL3-St) dan sungai Brantas (B2-St dan B3-St). Hal ini disebabkan *septic tank* mengandung *Salmonella* dan bakteri patogen lainnya dengan densitas yang lebih banyak dibandingkan dengan sungai dan air selokan. Densitas isolat bakteriofage tersebut digunakan untuk menentukan volume bakteriofage dalam uji aktivitas bakteriofage terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi* dan untuk menentukan isolat bakteriofage yang akan

digunakan untuk uji aktivitas.

Jumlah fage dan bakteri inang merupakan faktor terpenting dalam replikasi virus. Jumlah bakteri inang yang sedikit akan memengaruhi jumlah fage dan proses infeksi. Replikasi fage akan terjadi apabila sedikitnya terdapat 10^4 bakteri inang per mL. Faktor lain yang memengaruhi jumlah dan kemampuan fage di perairan adalah adanya bahan organik, radiasi ultraviolet, suhu, pH, salinitas, dan aktivitas metabolisme bakteri non-inang (Grabow, 2001; Suttle, 2016). Radiasi ultraviolet merupakan salah satu faktor yang tidak memengaruhi aktivitas bakteriofage di *septic tank* sehingga densitas bakteriofage di sumber ini lebih banyak dibandingkan sungai dan air selokan.

Tabel 3. Densitas isolat bakteriofage

No	Isolat	PFU/mL	Isolat Terpilih
1	B2-St	$3,20 \times 10^8^*$	B2-St
	B3-St	$1,50 \times 10^7$	
2	S1-St	$2,53 \times 10^7$	S2-St
	S2-St	$1,20 \times 10^{10^*}$	
3	SL1-St	$8,10 \times 10^6$	SL3-St
	SL3-St	$3,20 \times 10^9^*$	

Keterangan: (*) isolat bakteriofage yang digunakan dalam uji aktivitas

Aktivitas Isolat Bakteriofage terhadap Pertumbuhan *Salmonella Typhi*

Isolat bakteriofage B2-St, SL3-St, S2-St merupakan isolat terpilih yang memiliki densitas tertinggi yang mewakili dari ketiga

jenis asal sampel (Tabel 3). Hal ini dilakukan selain agar mendapatkan nilai MOI 50 diharapkan dengan semakin tinggi densitas sel maka aktivitas penghambatannya akan semakin baik. Selama selang waktu 12 jam,

densitas sel *Salmonella* Typhi pada inokulum perlakuan (penambahan isolat bakteriofage) menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol (tanpa bakteriofage). Secara keseluruhan, jumlah sel *Salmonella* Typhi pada inokulum kontrol lebih banyak ($1,3 \times 10^8$ sel/mL) dibandingkan perlakuan, yaitu S2-St, SL3-St dan B2-St secara berurutan adalah $6,6 \times 10^7$ sel/mL, $4,1 \times 10^7$ sel/mL dan $9,5 \times 10^6$ sel/mL (Gambar 2).

Pemberian bakteriofage menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sel *Salmonella* Typhi akibat lisis oleh aktivitas litik bakteriofage dalam waktu tertentu. Bakteriofage B2-St merupakan fage terbaik karena dapat menurunkan jumlah sel *Salmonella* Typhi terendah dengan rata-rata $9,5 \times 10^6$ sel/mL (Gambar 2). Penurunan jumlah sel *Salmonella* Typhi menunjukkan nilai yang signifikan pada jam ke-2 dengan perlakuan bakteriofage B2-St ($9,3 \times 10^6$ sel/mL), sedangkan perlakuan bakteriofage SL3-St dan S2-St dapat menurunkan jumlah sel *Salmonella* Typhi signifikan hanya pada jam ke-0 setelah pemberian bakteriofage. Hal ini dikarenakan jumlah sel *Salmonella* Typhi awal dari ketiga inokulum berbeda namun masih berkisar 10^6 sel/mL. Peningkatan jumlah sel *Salmonella* Typhi terjadi secara bertahap di setiap perlakuan bakteriofage setelah mencapai titik penurunan jumlah sel *Salmonella* Typhi yang signifikan, dan hal ini terjadi sampai tahap akhir pengamatan (jam ke-12). Akan tetapi, jumlah sel *Salmonella* Typhi pada perlakuan tersebut masih di bawah kontrol. Peningkatan jumlah sel *Salmonella* Typhi terjadi diduga karena kecepatan replikasi virus lebih lambat daripada replikasi *Salmonella* Typhi, sehingga jumlah sel meningkat cukup signifikan. Ada dua faktor yang memengaruhi aktivitas bakteriofage. Pertama, bakteriofage yang baru saja diisolasi memiliki aktivitas litik terbaik dibandingkan isolat bakteriofage yang

telah lama disimpan. Faktor berikutnya adalah jumlah bakteriofage yang lebih sedikit dibandingkan jumlah sel *Salmonella* sehingga tidak dapat melisis *Salmonella* secara optimal (Filho et al, 2007).

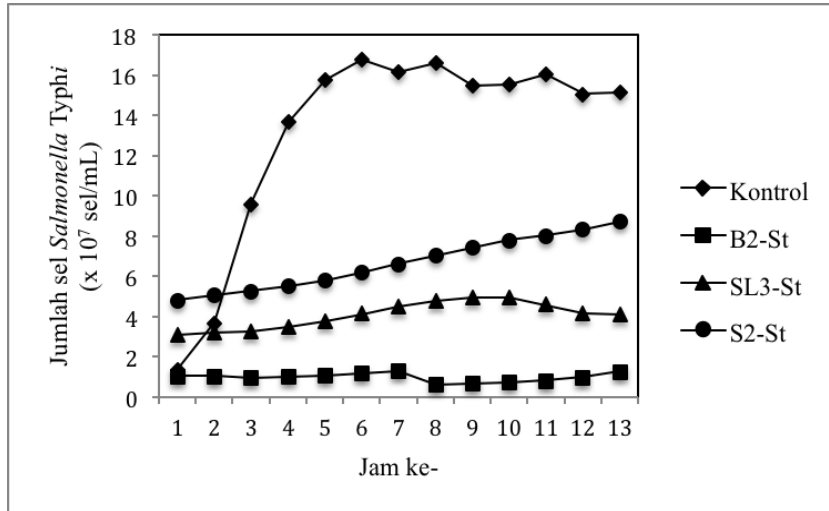
Berdasarkan densitas fage, isolat S2-St memiliki densitas tertinggi ($1,20 \times 10^{10}$ PFU/mL) dibandingkan dengan kedua isolat bakteriofage lainnya B2-St ($3,20 \times 10^8$ PFU/mL) dan SL3-St ($3,20 \times 10^9$ PFU/mL). Hasil penelitian menunjukkan bahwa B2-St merupakan fage terbaik, meskipun memiliki densitas yang lebih sedikit dibandingkan S2-St dan SL3-St. Hal ini diduga karena jenis virus yang menginfeksi berbeda, sehingga memiliki kemampuan menginfeksi, bereplikasi dan melisis bakteri yang berbeda (Filho et al, 2007).

Prokariotik memiliki sistem perusak DNA (*DNA destruction systems*) yang dapat merusak DNA virus yang diinjeksikan dengan memanfaatkan enzim restriksi endonuklease. Enzim tersebut merupakan bagian dari mekanisme sel inang untuk mencegah invasi asam nukleat asing. Enzim restriksi bersifat spesifik hanya pada DNA virus bukan RNA virus. Beberapa virus dapat mengatasi adanya hal tersebut dengan memodifikasi asam nukleatnya. Modifikasi secara kimia yang dilakukan adalah glukosilasi dan metilasi. Pada bakteriofage tipe T (T2, T4 dan T6), DNA virus akan mengalami glukosilasi untuk mencegah adanya enzim restriksi endonuklease dari sel inang, sedangkan metilasi yaitu asam nukleat virus dimodifikasi melalui replikasi genomik oleh protein modifikasi yang dikode virus (Madigan et al, 2010).

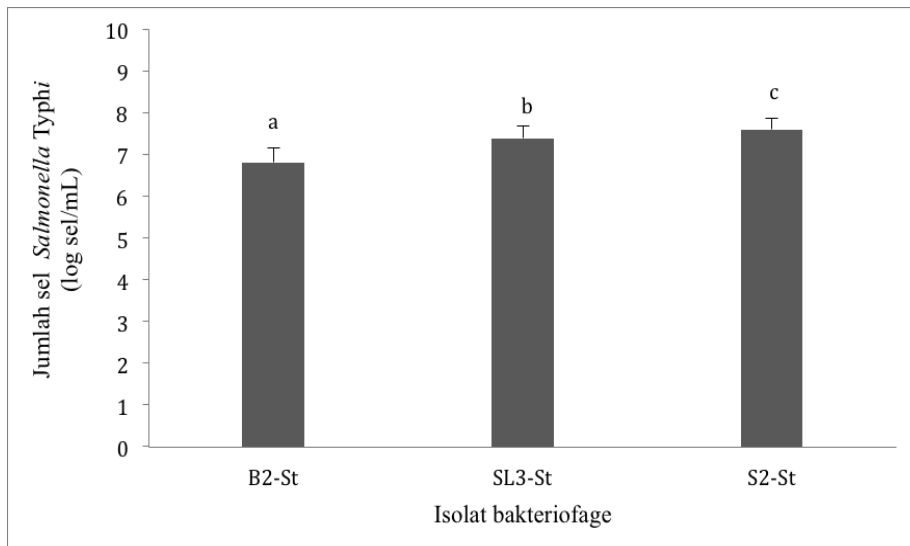
Lain halnya dengan bakteriofage T3 dan T7 yang mencegah sistem restriksi dengan mengkode protein yang dapat menghambat sistem restriksi inang. Namun hal ini juga diikuti perlawanan oleh sel inang dengan multi

ple restriction dan sistem metilasi yang dapat mencegah infeksi virus. Sel inang memiliki DNA *methylases* yang berperan sebagai DNA *repair* untuk melindungi inang dari enzim

endonuklease asing. Hal ini yang menjadi dasar evolusi dan resistensi antara inang sel prokariotik dan virus yang menginfeksi (Madigan et al, 2010).



Gambar 2. Hasil uji aktivitas bakteriofage



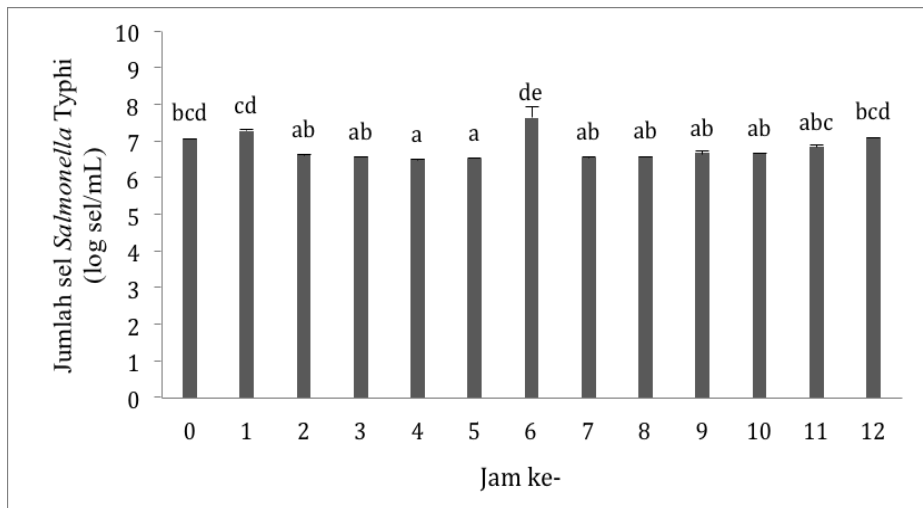
Gambar 3. Pengaruh jenis fage terhadap jumlah sel *Salmonella Typhi*
Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata dengan $p < 0,05$

Jenis fage memengaruhi jumlah sel *Salmonella* Typhi secara signifikan ($p < 0,05$). Kemampuan isolat bakteriofage B2-St dalam melisis sel *Salmonella* Typhi tampak lebih tinggi ($6,81 \pm 0,35$ log sel/mL) daripada isolat bakteriofage SL3 ($7,39 \pm 0,31$ log sel/mL) dan S2 ($7,60 \pm 0,27$ log sel/mL), secara berurutan (Gambar 3). Hal ini dapat disimpulkan bahwa isolat bakteriofage B2-St merupakan fage terbaik dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella* Typhi dibandingkan dengan kedua isolat bakteriofage lainnya. Namun demikian, bakteriofage tersebut tidak bisa menghilangkan/ melisis bakteri uji secara keseluruhan. Menurut Sulakvelidze (2013), salah satu permasalahan dalam pengaplikasian bakteriofage adalah bakteri patogen tidak bisa secara total dihilangkan atau dilisiskan. Alasan atas fenomena ini belum diketahui jawabannya. Satu hal yang mungkin terjadi adalah tidak semua partikel bakteriofage dapat menempel pada semua sel bakteri.

Berdasarkan uji Brown-Forsythe dengan uji lanjutan Games-Howell, diketahui bahwa isolat bakteriofage B2-St mampu menurunkan jumlah sel *Salmonella* Typhi sampai mencapai

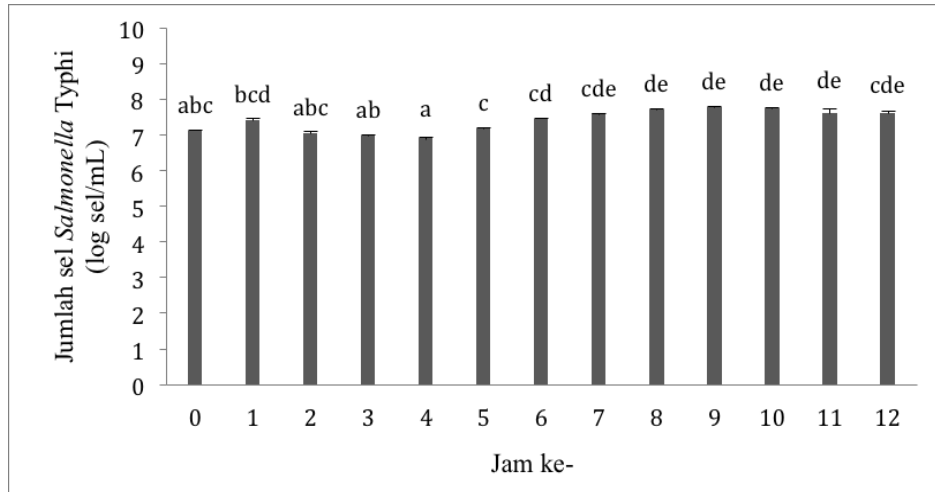
nilai terendah pada jam ke-4 dan ke-5, yaitu $6,50 \pm 0,03$ log sel/mL dan $6,53 \pm 0,02$ log sel/mL, secara berurutan (Gambar 4). Dengan demikian, lama waktu yang dibutuhkan untuk memberikan efek penghambatan yang terbaik adalah pada jam ke-4. Hasil yang hampir sama ditunjukkan oleh aktivitas isolat bakteriofage SL3-St. Aktivitas penghambatan optimum terhadap pertumbuhan *Salmonella* Typhi terjadi pada jam ke-4 (Gambar 5).

Berbeda dengan kedua isolat sebelumnya, isolat bakteriofage S2-St tidak menunjukkan aktivitas penghambatan yang cukup signifikan (Gambar 6). Meskipun hasil analisis statistik menunjukkan pada jam ke-0 densitas sel *Salmonella* Typhi adalah paling rendah, namun jumlah sel bakteri cenderung mengalami peningkatan sampai akhir pengamatan. Pada setiap perlakuan bakteriofage, setelah mencapai titik terendah, jumlah sel *Salmonella* Typhi mengalami peningkatan secara bertahap. Hal ini menunjukkan bahwa *Salmonella* Typhi berusaha melawan virus tersebut sehingga pertumbuhan sel bakteri tersebut menjadi lebih baik.



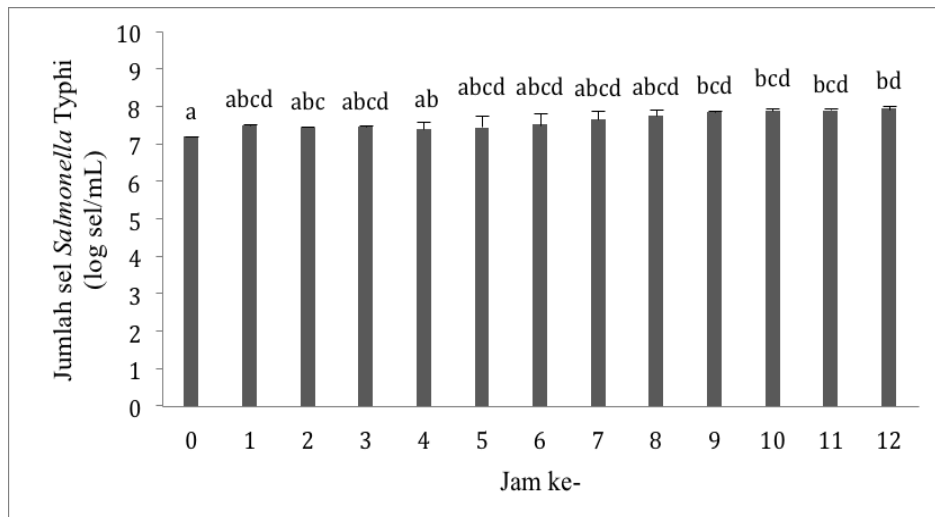
Gambar 4. Pengaruh isolat bakteriofage B2-St tiap jam terhadap jumlah sel *Salmonella* Typhi

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata dengan $p < 0,05$



Gambar 5. Pengaruh isolat bakteriofage SL3-St tiap jam terhadap jumlah sel *Salmonella* Typhi

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata dengan $p < 0,05$



Gambar 6. Pengaruh isolat bakteriofage S2-St tiap jam terhadap jumlah sel *Salmonella* Typhi

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata dengan $p < 0,05$.

Peningkatan jumlah sel inang diduga disebabkan beralihnya siklus hidup virus menuju fase lisogenik. Proses infeksi virus diawali dengan mengenali protein reseptor spesifik pada dinding sel suatu bakteri dan dilanjutkan menginjeksikan DNA virus ke dalam sel. Kemudian, siklus virus masuk dalam fase litik ataupun lisogenik ditentukan

oleh ekspresi protein cI dan cro. Pada awalnya lisogenik diekspresikan dengan dibantu protein cII dan cIII di PRE (*promoter right for establishment*) dan mentranskripsi gen cI untuk menghasilkan protein cI. Protein tersebut akan mencegah transkripsi gen N yang berperan penting dalam mengekspresikan gen-gen dalam siklus litik. Proses lisogenik bersai

ng dengan transkripsi dari PR gen *cro* untuk siklus litik. *Cro* dan *cI* bersaing dalam mengikat daerah promotor atau operator yang kompleks termasuk PRM dan PR dimana siklus litik dan lisogenik ditentukan (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Protein *cro* merupakan suatu protein *repressor* yang dapat mencegah terjadinya proses transkripsi PL dan PR dengan mengikat OL (*operator left*) dan OR (*operator right*). Proses ini akan mengikat operator dari *site 3*, kemudian *site 2*, *site 1* dan menonaktifkan sintesis *cI*, menjadikan protein *cII* dan *cIII* tidak dapat disintesis untuk terjadinya siklus lisogenik (Madigan et al, 2010).

Ada beberapa faktor yang harus dipenuhi supaya fase lisogenik dapat terjadi yaitu produksi *late protein* harus dicegah dan asam nukleat virus harus masuk ke dalam genom bakteri. *Late protein* dapat dicegah dengan mengekspresikan gen *cI* untuk menghasilkan protein *lambda repressor*. Gen *cI* terletak diantara PL dan PR. Promotor-promotor tersebut dapat menghasilkan mRNA untuk menghasilkan PE (*promotor establishment*) yang harus diaktifkan agar protein *lambda repressor* dapat disintesis dan siklus lisogenik dapat terjadi. Gen *cII* menghasilkan protein *cII* atau PE *activator protein* yang dapat mengaktifkan PE. Namun protein *cII* bersifat tidak stabil dan dapat didegradasi oleh enzim protease dari sel inang. Hal ini dapat dicegah dengan mengekspresikan gen *cIII* untuk menghasilkan protein *cIII* agar gen *cII* tetap stabil. Apabila gen *cII* stabil, selanjutnya akan mengaktifkan PE dan protein *lambda repressor* (*cI*) akan dihasilkan (Madigan et al, 2010). Stabilitas *cII* juga ditentukan oleh jumlah energi dalam sel. Suatu sel dengan energi yang cukup memiliki *cyclic AMP* (*cAMP*) dalam jumlah sedikit, namun ketika sel kekurangan energi (misalnya glukosa dalam jumlah sedikit), jumlah *cAMP* akan

menjadi tinggi. Jumlah *cAMP* yang tinggi menjadikan *cII* stabil dan fase lisogenik ikut stabil (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Protein *lambda repressor* mengikat OL dan OR seperti halnya protein *cro*, namun perbedaannya adalah mengikat operator dari *site 1*, *site 2*, kemudian *site 3* dan menonaktifkan PR (PL pada mekanisme yang sama). Ketika hal tersebut terjadi, semua sintesis protein akan dihentikan dan siklus litik tidak akan terjadi. Tanpa protein *cII*, PE tidak dapat aktif dan protein *lambda repressor* tidak dapat dihasilkan. Oleh karena itu, siklus lisogenik harus dapat dipertahankan dengan gen *cI* terus ditranskripsi. Salah satu caranya adalah virus harus mengaktifkan PM (*Promotor Maintenance*) untuk mengaktifkan gen *cI* sehingga protein *lambda repressor* dapat mengikat *site 1*, *site 2* dan *site 3*. Oleh karena itu, protein *lambda repressor* selain berfungsi sebagai *repressor* PR juga dapat mengaktifkan PM. Ketika PM aktif, protein *lambda repressor* semakin banyak dihasilkan dan siklus lisogenik dapat dipertahankan (Madigan et al, 2010).

Agen yang dapat menginduksi siklus lisogenik menjadi siklus litik adalah agen yang dapat merusak DNA yaitu ultraviolet irradiation, X-rays, dan senyawa kimia perusak DNA seperti nitrogen *mustard*. Ketika kerusakan DNA terjadi, maka sel inang akan melakukan mekanisme pertahanan yang disebut respon SOS (*save our souls*). Bentuk respon SOS adalah suatu protein yaitu *RecA* yang secara normal termasuk dalam rekombinasi genetik yang dikonversi menjadi protease. Protease merupakan enzim yang salah satu fungsinya adalah menghancurkan protein *lambda repressor*. Ketika protein *lambda repressor* tidak aktif, transkripsi fage akan terjadi (Madigan et al, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan pada tahap uji *host range*

bakteriofage, semua isolat bakteriofage (B2-St, B3-St, S1-St, S2-St, SL1-St SL3-St) mampu melisis sel bakteri *E. coli* dan *Salmonella* Typhimurium yang menandakan isolat bakteriofage yang didapatkan tidak spesifik pada *Salmonella* Typhi. Pemberian bakteriofage pada kultur *Salmonella* Typhi memengaruhi aktivitas pertumbuhan sel *Salmonella* Typhi. Penurunan densitas sel inang terendah terjadi pada jam ke-4 dan diikuti peningkatan jumlah sel inang yang terjadi secara bertahap. Bakteriofage B2-St merupakan bakteriofage terbaik karena dapat menurunkan jumlah sel *Salmonella* Typhi terendah ($6,81 \pm 0,35$ log sel/mL). Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menentukan efikasi isolat bakteriofage tersebut dalam mencegah atau menghambat pertumbuhan *Salmonella* Typhi pada produk pangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Nanik Dwi Rahayu selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya atas bantuan yang diberikan selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani, D. & Kurniawati, W. (2007). Pengaruh Asam Asetat dan Asam Laktat sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Salmonella* sp. yang Diisolasi dari Karkas Ayam. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor.
- Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L. & Wang, R. (2015). Bio-Control of *Salmonella* Enteridis in Foods Using Bacteriophages. *Viruses*, 7, 4836-4853.
- Clokie, M. R. J & Kropinski, A. M. (2009). *Bacteriophages: Methods and Protocols*. UK: Humana Press.
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G. & Lee, L.H. (2015). *Salmonella: A Review on Pathogenesis, Epidemiology and Antibiotic Resistance*. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293.
- Filho, R. L. A., Higgins, J. P., Higgins, S. E., Ganoa, G., Wolfenden, A. D., Tellez, G. & Hargis, M. (2007). Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis In Vitro and In Vivo. *Poultry Science*, 86, 1904-1909.
- Grabow, W. O. K. (2001). Bacteriophages: Update on Application as Models for Viruses in Water. *Water SA Journal*, 27, 251-268
- Hariyadi, P. (2008). Isu Terkini Terkait dengan Keamanan Pangan. http://seafast.ipb.ac.id/article/isu_terkini_keamanan_pangan.pdf.
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J.M. & Donoghue, A.M. (2005). Alternatives to Antibiotics: Utilization of Bacteriophage to Treat Colibacillosis and Prevent Foodborne Pathogens. *Poultry Science Journal*, 84, 655-659
- Kanjana. (2007). Isolation and Partial Characterization of *Salmonella* Typhi-Specific Bacteriophage. *KKU Science Journal*, 35(3), 162-169
- Kocharunchitt, C., Ross, T. & McNeil, D. L. (2008). Use of Bacteriophages as Biocontrol Agents to Control *Salmonella* Associated with Seed Sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 453-459.
- Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (2005). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida. United States : CRC Press.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. & Clark, D. P. (2010). *Brock Biology of Microorganisms (13th edition)*. USA: Pearson Education, Inc.
- Mahamuni, P. P., Patil, A. R. & Ghosh, J. S. (2017). Proteolytic and lipolytic properties of endotoxins (enterotoxins) produced by *Salmonella typhi* NCIM 5255, *Salmonella typhimurium* NCIM 2501 and *Shigella ex-neri* NCIM 5265. *International Food Research Journal*. 24(6), 2685-2688.
- O'Flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Coffey, A. (2004). Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 7(6), 3417-3424.
- Prescott, H. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology (Exercise 48: Isolation of Escherichia coli Bacteriophages from Sewage and Determining Bacteriophage Titers)*. Fifth Edition. USA: The McGraw-Hill Companies.
- Sillankorva, S. M., Oliviera, H. & Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *International Journal of Microbiology*. 1-13.
- Silva, J. B., Storms, Z. & Sauvageau, D. (2016). Host Receptors for Bacteriophage Adsorption. *FEMS Microbiology Letters*. 363(4), 1-11.
- Sonderholm, J. (2008). Use of Antibiotic in Food Animals. http://www.Keepantibioticsworking.com/new/indepth_keyevind.cfm.
- Stephenson, F. H. (2003). *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (A Guide to Mathematics in the Laboratory)*. United State: Academic Press.
- Strauch, E., Hammerl, J. A. & Hertwig, S. (2007). *Bacteriophages: New Tools for Safer Food*. Berlin. Germany: Bundesinstitut für Risikobewertung
- Sulakvelidze, A. (2013). Using Lytic Bacteriophages to Eliminate or Significantly Reduce Contamination of Food by Foodborne Bacterial Pathogens. *Journal of the Food and Agriculture*. 93, 3137-3146.
- Suttle, C.A. (2016). Viral Diversity on the Global Stage. *Nature Microbiology*. 1, 1-2.
- Winarti, C. & Miskiyah. (2010). Status Kontaminan Pada Sayuran dan Upaya Pengendaliannya di Indonesia. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. *Pengembangan Inovasi Pertanian*. 3(3), 227-237.
- Wray, C. (2003). *Salmonella: Properties and Occurrence*. UK: Elsevier Science Ltd.