

PURIFIKASI *PHAGE COCKTAIL* SERTA SPEKTRUM PENGHAMBATANNYA TERHADAP BAKTERI PENYEBAB FOODBORNE DISEASE

Purification of Phage Cocktail and its Inhibition Spectrum to Foodborne Disease Bacteria

Lia Oriana Nindita¹, Agustin Krisna Wardani^{2*}

¹Program Double Degree Bioteknologi Agroindustri – Fakultas Teknologi Pertanian –
Universitas Brawijaya Jl. Veteran – Malang 65145

²Jurusan Teknologi Hasil Pertanian – Fakultas Teknologi Pertanian –
Universitas Brawijaya Jl. Veteran – Malang 65145

*Penulis Korespondensi: email agustinwardani@ub.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan purifikasi *phage* campuran (*phage cocktail*) untuk mendapatkan *phage* murni (*single phage*) dan menguji aktivitas penghambatan *phage* murni terhadap bakteri patogen dan non-patogen. *Phage* murni yang diperoleh yaitu ϕ LA-1 menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Eschericia coli*, *Salmonella thypi*, and *Listeria monocytogenes*, namun tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Lactobacillus plantarum*. Berdasarkan *plaque* yang terbentuk, ϕ LA-1 lebih efektif menghambat *Shigella flexneri* dibandingkan strain lainnya, yaitu dengan terbentuknya *plaque* sebesar 1.37×10^8 PFU/mL. Lebih lanjut, ϕ LA-1 dapat mereduksi jumlah sel bakteri target pada media tumbuh rata-rata setelah 8 jam. Berdasarkan elektroforesis gel agarosa, ϕ LA-1 mempunyai ukuran genom sebesar 21226 bp.

Kata kunci: purifikasi, *phage cocktail*, *plaque*, bakteri patogen, keracunan makanan

ABSTRACT

The aim of this research is to purify a *phage cocktail* to obtain a *single phage* and evaluate the broad host range of a *single phage*. The obtained *single phage* (ϕ LA-1), was found to attack strains of *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Eschericia coli*, *Salmonella thypi*, and *Listeria monocytogenes*, but not members of the strains *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Lactobacillus plantarum*. The data showed that ϕ LA-1 is more effective to attack the *Shigella flexneri* than other strain with the burst size of $1.37 \cdot 10^8$ PFU/ml. It can reduced the cell numbers of their positive bacteria targets after 8 hr. The complete nucleotide sequence of the genome 21226 basepairs of ϕ LA-1 was determined.

Keywords: purification, *phage cocktail*, *plaque*, pathogen bacteria, foodborne disease

PENDAHULUAN

Data statistik kasus keracunan makanan (*foodborne disease*) diberbagai negara semakin mengkhawatirkan. Pada tahun 2005 Centers for Disease Control Prevention (CDC) melaporkan bahwa bakteri patogen yang dikenal telah menyebabkan 14 juta orang sakit, 60000 orang dirawat inap dan 1800 orang meninggal tiap tahun di Amerika serikat. Berdasarkan Risesdas Depkes RI tahun 2007 melaporkan bahwa salah satu penyakit yang ditularkan melalui makanan dan minuman adalah diare sebesar

9% (Litbangkes, 2007). Keracunan makanan dapat disebabkan oleh baktei patogen seperti *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Campylobacter*.

Usaha untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen sudah banyak dilakukan, misalnya dengan perlakuan fisik, kimia maupun biologis. Perlakuan biologis (misalnya antimikroba) lebih cenderung efektif dibandingkan yang lainnya karena tidak memiliki efek yang tidak diinginkan. Kelemahan dari perlakuan fisik bisa menyebabkan perubahan kualitas sensoris produk makanan (misalnya karena efek

pemanasan atau irradiasi), sedangkan kelemahan dari perlakuan kimia dapat menyisakan residu bahan kimia pada produk makanan sehingga berdampak negatif pada tubuh (Sofos, J.N. dan Smith, G.C., 1998; Bacon, R.T. *et al.*, 2000). Penggunaan antimikroba seperti bakteriofag dalam mengontrol bakteri patogen memberikan alternatif untuk meningkatkan keamanan pangan. Bakteriofag/ *phage* (Φ) merupakan virus yang menginfeksi bakteri, dapat menyebabkan bakteri lisis dan mati setelah bakteriofag berkembang biak di dalam bakteri dan keluar dari bakteri dengan jumlah yang sangat banyak (Mayer, 2010). *Virulent phage* (bakteriofag yang eksklusif mengakibatkan lisis) memiliki banyak keuntungan sebagai biokontrol maupun agen terapi karena kemampuannya dalam menyerang bakteri dan tidak mempunyai pengaruh terhadap jenis sel lain termasuk sel manusia, hewan dan tanaman (Snyder dan Champness, 2003). Berdasarkan United States Food and Drug Administration (2006), bakteriofag pada keju dapat digunakan untuk membunuh bakteri *Listeria monocytogenes* dan tergolong dalam GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Bakteriofag dibedakan menjadi dua jenis, yaitu *phage cocktail* dan *single phage*. Penggunaan *phage cocktail* kurang efektif, karena penanganan dan akurasi dalam perhitungan konsentrasi kurang maksimal serta dapat menimbulkan efek *phage-resistant*. Bakteriofag murni (*single phage*) lebih menguntungkan dibanding dengan bakteriofag campuran, karena akurasi dalam perhitungan konsentrasi lebih mudah sehingga bisa diaplikasikan pada produk pangan maupun *non-pangan* (*phage therapy*).

Pada penelitian ini digunakan Φ U14 yang merupakan *phage cocktail* yang bersifat *virulent* dan diisolasi dari sampel usus ayam pada penelitian Nurrisziawan (2010). Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap pertama melakukan purifikasi *phage cocktail* untuk mendapatkan *phage* murni dan tahap kedua menguji aktivitas penghambatan *phage* murni terhadap bakteri patogen dan *non-patogen*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bakteri target yang digunakan adalah *Salmonella thypimurium*, *Eschericia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*,

Listeria monocytogenes. *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan THP-FTP, UB. Kultur tersebut ditumbuhkan dalam media agar miring *nutrient agar* (oxoid), diinkubasi 37 °C selama 24 jam.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai derajat kemurnian pro analisis (p.a) kecuali beberapa bahan yang bersifat teknis. Bahan-bahan yang bersifat pro analisis : CaCl_2 , BSA, EDTA, Tris-HCl, NaCl, PEG 400, SDS, potassium asetat (KOAC), etanol (70%), etanol dingin (96%), buffer TE, buffer TAE, agarosa, etidium bromida. Semua bahan pro analisis ini bermerek Merck, Bio-Rad dan Oxoid. Bahan yang bersifat teknis *nutrient broth* dan *nutrient agar* (dibeli dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan, THP,UB), HCl, NaOH (Makmur Sejati).

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini timbangan digital (Mettler toledo tipe AL204), mikropipet (socorex tipe Acura 825), *bluetip*, *yellowtip*, *shaker* (Julabo tipe SW22), inkubator (Binder tipe L7053099003101), autoklaf (Autoclave tipe HL36AE), Vortex, kulkas (Gacio tipe non CFC), *laminar air flow* (LAF) (Captair Bio by Erlab), spektrofotometer UV-Vis (Jenway tipe 630S), pH meter (Eutech Instrument tipe 510), nanodrop (Nanodrop/ND-1000), piranti elektroforesis DNA (Optima/Mupid-2 plus), sentrifugator (Hettich Zentrifugen tipe Mikro 22 R) dan *glassware*.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama adalah melakukan purifikasi *phage* campuran untuk mendapatkan *phage* murni dan tahap kedua adalah menguji aktivitas penghambatan *phage* murni terhadap bakteri patogen dan *non-patogen* berdasarkan pengamatan *plaque* yang terbentuk dan pengamatan nilai absorbansi jumlah sel bakteri target pada 600 nm.

Produksi *phage cocktail* Φ U14 (Ellis, 2007)

Produksi *phage cocktail* (Φ U14) dilakukan dengan menyiapkan *host* terlebih dahulu. *Host* yang digunakan adalah *Shigella flexneri* strain FBD002 yang berumur 18-20 jam. Seratus mikroliter *host* potensial

ditambahkan pada 10 mL NB kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 90 menit. Sebanyak 100 µl CaCl_2 0.3 M dan 100 µl *phage lysate* (*phage cocktail* ΦU14 dari penelitian sebelumnya) ditambahkan ke dalam media NB tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C hingga larutan menjadi bening. Lalu larutan tersebut disentrifus pada kecepatan 6000 rpm, suhu 5 °C selama 10 menit kemudian filtrat yang terbentuk disaring dengan filter steril 0.22 µm. Filtrat steril yang berisi *phage cocktail* ΦU14 inilah yang disebut *phage lysate* kemudian *stock phage lysate* ΦU14 disimpan pada suhu -80 °C.

Purifikasi *phage cocktail* ΦU14 (Oliveira et al., 2009)

Teknik purifikasi bakteriofag pada dasarnya sama dengan purifikasi bakteri, yaitu dengan pengamatan morfologi fisik yang dihasilkan. Pengamatan morfologi pada bakteriofag berdasarkan pada terbentuknya *single plaque*, sedangkan pengamatan morfologi pada bakteri berdasarkan terbentuknya *single colony*. *Plaque* merupakan zona bening yang terbentuk pada media *double layer agar* akibat lisisnya bakteri oleh bakteriofag. Metode *double layer agar* dilakukan dengan menyiapkan *hard agar* 1.5% NA, kemudian menyiapkan 5 mL *soft agar* 0.7% NA yang sebelumnya telah dicampur dengan 100 µl *host potensial*, 100 µl CaCl_2 0.3 M, dan 100 µl *phage lysate* (larutan campuran). Larutan campuran tersebut kemudian ditambahkan pada *hard agar* 1.5% NA kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 6 jam sampai terbentuknya *plaque* (Adams et al., 1959). Teknik purifikasi bakteriofag pada dasarnya menggunakan prinsip metode *double layer agar* namun untuk mendapatkan *single plaque* yang murni dibutuhkan tahap pengenceran *phage lysate* terlebih dahulu. Dari masing-masing pengenceran, diambil 100 µl *phage lysate* kemudian dilakukan metode *double layer* lagi. *Single plaque* yang terbentuk dari pengenceran tertinggi dipilih dengan asumsi semakin seragam *single plaque* yang terbentuk maka semakin murni bakteriofag yang dihasilkan (Oliveira, et al., 2009). Setelah diperoleh *single plaque* (ΦLA-1) dengan morfologi yang seragam, selanjutnya dibuat *stock phage lysate* ΦLA-1 dengan metode yang sama dengan produksi bakteriofag sebelumnya.

Perhitungan konsentrasi bakteriofag (Adams et al., 1959)

Perhitungan konsentrasi bakteriofag pada dasarnya sama dengan perhitungan konsentrasi bakteri yaitu menggunakan *Standart Plate Count/ SPC*. Jika pada bakteri yang dihitung adalah banyaknya koloni sedangkan pada bakteriofag adalah terbentuknya *plaque*. *Plaque* yang terbentuk dihitung dengan satuan PFU/mL (*Plaque Forming Unit/mL*) (Adams, et al., 1959).

Aktivitas penghambatan ΦLA-1 terhadap bakteri patogen dan non-patogen berdasarkan *plaque* yang terbentuk (Lu et al., 2003)

Plaque yang terbentuk menandakan kemampuan ΦLA-1 dalam melisis bakteri patogen maupun non-patogen. Bakteri target yang digunakan meliputi bakteri patogen, yaitu *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Bacillus cereus* dan bakteri non-patogen yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum*. Pada dasarnya uji penghambatan ini menggunakan metode *double layer agar* namun *host* yang digunakan diganti dengan bakteri target.

Aktivitas penghambatan ΦLA-1 terhadap bakteri patogen dan non-patogen berdasarkan pengamatan nilai absorbansi jumlah sel bakteri target pada 600 nm (Bicalho et al., 2009)

Media *nutrient broth* disiapkan untuk 2 perlakuan, perlakuan pertama meliputi media *nutrient broth* dinokulasi dengan masing-masing 100 µL bakteri patogen dan non-patogen berumur 18-24 jam (1×10^5 cfu/mL), lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam kemudian ditambahkan dengan 100 µl CaCl_2 0.3 M dan 100 µl *phage lysate*. Pelakuan kedua, media *nutrient broth* dinokulasi dengan masing-masing dengan 100 µl bakteri patogen dan non-patogen berumur 18-24 jam (1×10^5 cfu/mL), lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam kemudian ditambahkan dengan 100 µl CaCl_2 0.3 M dan tanpa penambahan *phage lysate*. Pengamatan pertumbuhan sel ini dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi dari kedua perlakuan tersebut pada 600 nm tiap 0.5 jam selama 6 jam pertama lalu dilanjutkan tiap 2 jam sampai 24 jam.

Ekstraksi DNA Φ U14 (Sambrook et al., 1989)

Teknik ekstraksi DNA *phage* dilakukan dengan presipitasi *phage lysate* dengan *Polyethylene glycol* (PEG) dan NaCl (Sambrook et al., 1989). Dengan menggunakan PEG dan NaCl, partikel *phage* akan terpresipitasi sehingga ketika selesai disentrifugasi maka partikel tersebut akan mengendap. Setelah mengendap, pelet tersebut diresuspensi dengan buffer lisis (100 mM Tris-HCl dan 100 mM NaCl) lalu ditambahkan dengan 4% SDS. Proses selanjutnya adalah pemisahan DNA dari komponen sel yang lain atau kontaminan yang tidak diinginkan dengan menggunakan potasium asetat (KOAC). Sentrifus dilakukan kembali untuk mengendapkan membran-membran yang lisis, sehingga yang diambil hanya supernatan (larutan bening yang berisi DNA). Supernatan yang berisi DNA ditambahkan isopropanol dan etanol yang berfungsi untuk menghilangkan komponen-komponen lain dalam sel, misalnya protein. DNA tidak larut dalam etanol, maka dengan pemberian etanol maka DNA akan mengalami presipitasi, yaitu pengendapan DNA. DNA dipisahkan dengan sentrifus dan dicuci dengan etanol 70% dan 96%, dikeringanginkan dan selanjutnya dilarutkan pada buffer TE (1 M Tris-HCl dan 0.5 M EDTA). Setelah itu, DNA *phage* dianalisa secara kuantitatif maupun kualitatif (Sambrook et al., 1989).

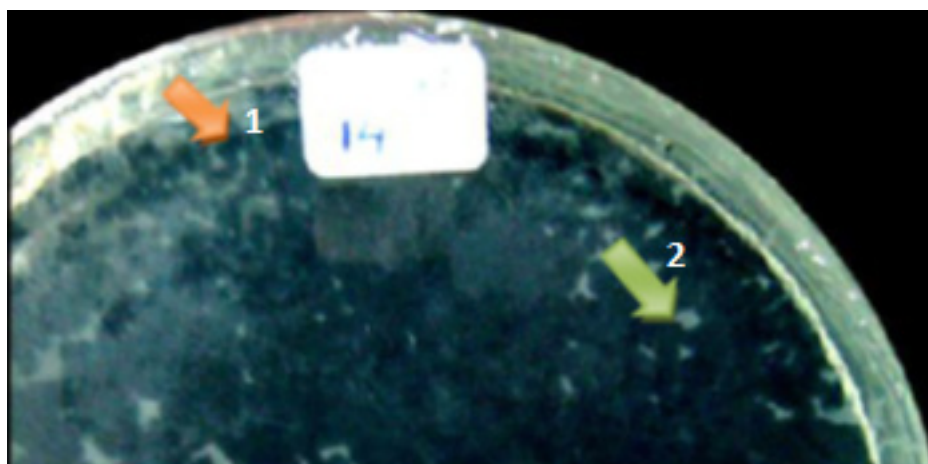
HASIL DAN PEMBAHASAN

Purifikasi *Phage Cocktail* Φ U14

Pada penelitian ini digunakan Φ U14 yang diisolasi dari sampel usus ayam

(Nurrizkiawan, 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa Φ U14 dengan sel inang *Shigella flexneri* strain FBDOO2 merupakan *phage cocktail* dan bersifat *virulent*. *Phage cocktail* merupakan bakteriofag campuran (lebih dari satu bakteriofag), sedangkan *virulent phage* mengacu pada bakteriofag yang eksklusif mengakibatkan lisis. Dari penelitian sebelumnya, diketahui bahwa *phage cocktail* Φ U14 memiliki spektrum penghambatan yang luas (beberapa *species* bakteri) seperti *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* bahkan inangnya sendiri yaitu *Shigella flexneri* strain FBDOO2. Kemampuan bakteriofag dalam melisis bakteri diindikasikan dengan terbentuknya *plaque*, dimana *plaque* hanya diakibatkan oleh *virulent phage* sedangkan *temperate phage* tidak memiliki kemampuan melisis bakteri. Materi genetik bakteriofag akan bergabung selamanya dengan materi genetik (DNA) bakteri akibat serangan dari *prophage* atau *temperate phage*. Pada daur hidup *temperate phage* atau yang biasa disebut daur lisogenik terdiri dari fase adsorpsi, fase infeksi, fase penggabungan dan fase pembelahan. Pada daur hidup lisogenik ini, membran plasma tidak mengalami lisis. Kemampuan *phage cocktail* Φ U14 dalam melisis bakteri patogen dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan terbentuknya *plaque* akibat infeksi *phage cocktail* Φ U14 terhadap bakteri patogen. *Plaque* yang terbentuk sangat banyak dan bervariasi sehingga hanya sebagian kecil bakteri indikator yang masih tampak. Menurut Ellis (2007), *plaque* terbentuk karena adanya infeksi bakteriofag terhadap bakteri indikator / target.



Gambar 1. Terbentuknya plaque pada isolat U14, ➡ 1: bakteri indikator/lawn, ➡ 2 : plaque

Dari satu bakteriofag yang menginfeksi bakteri maka akan dihasilkan 200-300 bakteriofag baru dengan efek bakteri terinfeksi menjadi lisis. Bakteriofag baru akan berdifusi kedalam agar dan mengulang proses infeksi. Area hasil infeksi bakteriofag ini disebut *plaque* (zona bening pada lapisan bakteri indikator). *Plaque* memiliki berbagai morfologi, ukuran dan bentuk pinggiran. *Plaque* yang terbentuk dari isolat U14 ini kemudian disebut dengan *phage cocktail* Φ U14. *Phage cocktail* tersebut memiliki morfologi *plaque* yang bermacam-macam sehingga diasumsikan terdapat lebih dari satu bakteriofag yang terdapat dalam Φ U14, oleh karena itu sebelum dilakukan tahapan purifikasi dilakukan kroscek terlebih dahulu yaitu dengan pengamatan morfologi *plaque* yang terbentuk pada media *double layer agar* seperti yang terlihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa *plaque* yang dihasilkan oleh Φ U14 begitu beragam, *plaque* ada yang berukuran besar, kecil dan ada yang bulat tidak sempurna. Ini menandakan bahwa Φ U14 yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Nurrisziawan, 2010) masih merupakan campuran bakteriofag. Untuk mengetahui apakah Φ U14 bersifat murni atau tidak maka dilakukan tahapan purifikasi sehingga setelah tahap purifikasi diharapkan diperoleh bakteriofag murni. Bakteriofag murni lebih menguntungkan dibanding dengan bakteriofag campuran, karena akurasi dalam perhitungan konsentrasi lebih mudah sehingga bisa diaplikasikan pada produk pangan maupun *non-pangan* (*phage therapy*). *Phage cocktail* memiliki kelemahan seperti dapat menimbulkan *phage-resistant*. Hal ini dapat disebabkan oleh konsentrasi dari *phage* yang terlalu tinggi sehingga menyebabkan sel bakteri mati secara cepat, menyerang

membran potensial dan membuat sel bakteri berikutnya mati sehingga tidak ada sel bakteri yang dapat dilisiskan dan akhirnya membuat *phage* menjadi resisten.

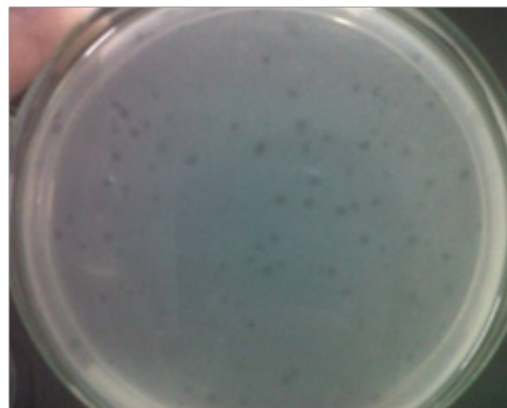
Prosedur purifikasi bakteriofag ada dua macam, yaitu umum dan khusus. Purifikasi umum bertujuan untuk memperoleh bakteriofag yang bersifat *lytic* atau *temperate*, hasilnya bersifat campuran (*phage cocktail*) sehingga tampak morfologi *plaque* yang bervariasi pada *double layer agar*. Sedangkan purifikasi khusus, tidak hanya bertujuan untuk memperoleh bakteriofag yang bersifat *lytic* namun juga ingin mengetahui spektrum penghambatan dari bakteriofag terhadap bakteri target, tingginya afinitas atau tingginya *burst* yang dimiliki oleh bakteriofag. Hasilnya sudah murni dan tampak morfologi *plaque* yang seragam pada *double layer agar* (Dillon dan Parry, 2007).

Pada penelitian ini digunakan purifikasi khusus, sehingga setelah dilakukan 3 kali purifikasi diperoleh morfologi *plaque* yang seragam dimana dapat diasumsikan bahwa bakteriofag yang diperoleh murni (Φ LA-1) (Gambar 3). Zona bening yang dihasilkan oleh bakteri indikator akibat infeksi bakteriofag (*plaque*) merupakan hal yang sangat krusial, dimana morfologi *plaque* yang bervariasi mengindikasikan beragamnya bakteriofag yang diperoleh. Prosedur *screening* bakteriofag yang umum dilakukan memungkinkan banyaknya bakteriofag yang dapat menginfeksi bakteri indikator (Comeau *et al.* 2006; Holmfeldt *et al.* 2007; Stenholm *et al.* 2008).

Gambar 3 menunjukkan bahwa Φ LA-1 merupakan *single* bakteriofag, hal ini diperkuat dengan hasil elektroforesis gel agarosa yang menunjukkan bahwa hanya



Gambar 2. Morfologi plaque yang dihasilkan oleh Φ U14



Gambar 3. Morfologi plaque yang dihasilkan oleh Φ LA-1

terdapat satu pita atau band yang muncul pada gel (Gambar 4) dengan nilai kemurnian DNA sebesar 1.73.

Gambar 4 menunjukkan bahwa ukuran DNA Φ LA-1 setara dengan ukuran *marker* terbesar yaitu 21226 bp. Ukuran DNA tersebut lebih besar bila dibandingkan dengan ukuran DNA dari *Bacillus phage* dan lebih kecil dari *Lactobacillus phage* (Tabel 1). Menurut Snyder and Champness (2003), bakteriofag bukan organisme hidup tetapi hanya terdiri dari materi genetik (DNA/RNA) yang dibungkus dengan protein atau membran lapisan luar. Menurut Ellis (2007), besar kecilnya ukuran bakteriofag berpengaruh pada kecepatan difusi bakteriofag dalam menginfeksi bakteri pada media agar (proses terbentuknya *plaque*). Semakin kecil ukuran bakteriofag maka semakin cepat kemampuannya difusinya dalam media agar dan makin banyak *plaque* yang terbentuk, begitu juga sebaliknya.

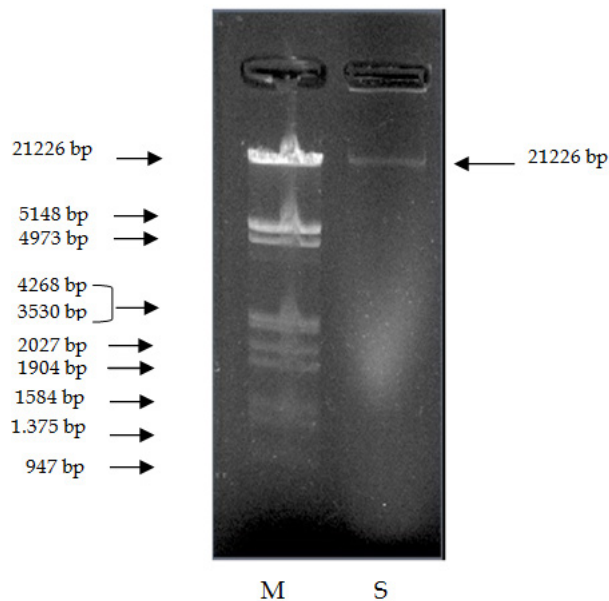
Produksi bakteriofag/ *Phage lysate* / Φ LA-1

Stok *phage lysate* disiapkan dengan tujuan memperoleh persediaan *phage lysate* yang cukup untuk digunakan pada saat

pengujian spektrum penghambatan. Apabila *phage lysate* habis sebelum seluruh pengujian selesai maka hasilnya akan berbeda. Hal ini terjadi karena terjadi perbedaan konsentrasi bakteriofag yang terdapat dalam *phage lysate*. Setelah stok *phage lysate* diperoleh maka dilakukan penghitungan total bakteriofag untuk mengetahui konsentrasi bakteriofag dari *phage lysate* tersebut. Penghitungan *phage lysate* Φ LA-1 dilakukan pada pengenceran 10^{-5} - 10^{-8} . Penghitungan total Φ LA-1 memberikan hasil konsentrasi bakteriofag sebanyak 1.37×10^8 CFU/mL. Konsentrasi bakteriofag ini diperoleh dari perhitungan jumlah *plaque* yang terdapat pada pengenceran 10^{-6} sebanyak 137 *plaque* yang terbentuk. Hasil penghitungan *plaque* pada pengenceran 10^{-6} dapat dilihat pada Gambar 3.

Aktivitas penghambatan Φ LA-1 terhadap bakteri patogen dan non-patogen berdasarkan *plaque* yang terbentuk (Lu et al., 2003)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Φ LA-1 memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Listeria monocytogenes*, *Eschericia coli*, *Salmonella*



Gambar 4. Elektroforesis gel agarosa dari DNA Φ LA-1, M = Marker lambda DNA/EcoR I + Hind III, S = DNA Φ LA-1

Tabel 1 Ukuran genom dari beberapa *Bacillus* and *Lactobacillus phages*

Phage	DNA size (bp)	Family	Host	Pustaka
Φ LA-1	21226	Podoviridae	<i>Shigella flexneri</i>	Pada penelitian ini
Φ 29	19285	Podoviridae	<i>Bacillus</i>	Horcadas et al., 2001
Φ GA-1	21129	Podoviridae	<i>Bacillus</i>	Horcadas et al., 2001
Φ B103	18630	Podoviridae	<i>Bacillus</i>	Horcadas et al., 2001
Φ PWH2	35000	Shipoviridae	<i>Lactobacillus sake</i> Ls2	Leuschner et al., 2001

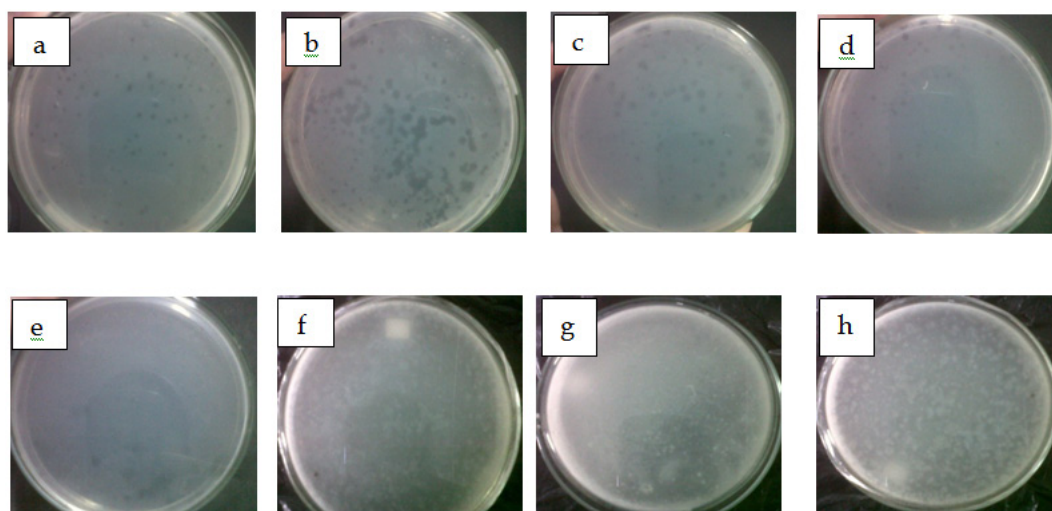
typhimurium, namun tidak memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Lactobacillus plantarum*. Terbentuknya *plaque* menunjukkan adanya aktivitas litik dari Φ U14 yang mampu menghambat bakteri target (Gambar 5)

Gambar 5 menunjukkan bahwa Φ LA-1 efektif menghambat pertumbuhan a) *Shigella flexneri*, b) *Shigella dysentri*, c) *Eschericia coli*, d) *Listeria monocytogenes* dan e) *Salmonella thypi*. Dari kelima bakteri patogen tersebut, Φ LA-1 paling efektif menghambat *Shigella flexneri* > *Shigella dysentri* > *Eschericia coli* > *Listeria monocytogenes* > *Salmonella thypi*. Efektifitas Φ LA-1 tersebut dapat dihitung dari jumlah *plaque* yang terbentuk, dimana semakin banyak jumlah *plaque* yang terbentuk maka kemampuan Φ LA-1 dalam menghambat bakteri target semakin efektif.

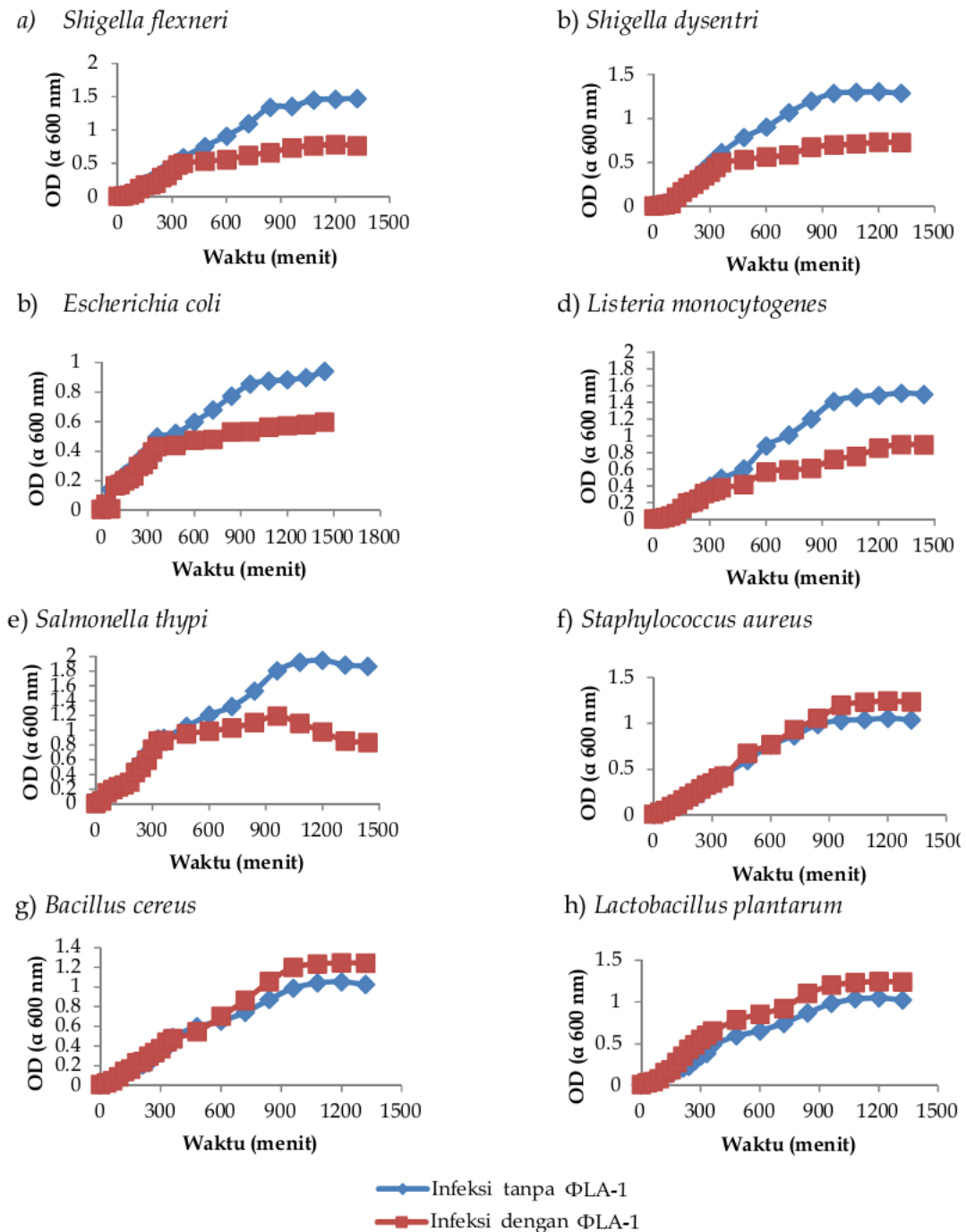
Plaque yang terbentuk menandakan kemampuan Φ LA-1 dalam melisis bakteri patogen. Lisisnya bakteri patogen disebabkan bakteri patogen memiliki reseptor yang sesuai dengan reseptor Φ LA-1. Pelekatan bakteriofag terhadap sel inang merupakan proses interaksi awal antara bakteriofag dengan molekul reseptor pada permukaan sel inang. Keberhasilan pelekatan diikuti dengan penetrasi asam nukleat bakteriofag ke dalam sel inang, selanjutnya bakteriofag bereplikasi dan menghasilkan bakteriofag baru. Menurut Mayer (2010), bakteriofag/ *phage* (Φ) merupakan virus yang menginfeksi bakteri, dapat menyebabkan bakteri lisis dan mati setelah bakteriofag berkembang biak di dalam bakteri dan keluar dari bakteri dengan jumlah

yang sangat banyak. Pada tahap pelekatan, terjadi ikatan spesifik antara molekul reseptor seluler dengan antireseptor pada bakteriofag, melalui penghubung yang terbentuk secara enzimatis oleh sel inang, asam nukleat dari bakteriofag diinjeksikan kedalam sitoplasma dari bakteri. Pada siklus litik, asam nukleat bakteriofag mengkode enzim *hijack* pada sistem metabolisme sel inang sebagai bentuk dari replikasi bakteriofag. Sel inang akan lisis dan bakteriofag akan lepas kemudian menginfeksi sel inang yang baru (Hudson *et al.*, 2006). Gambar 5 menunjukkan bahwa Φ LA-1 efektif menghambat *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Eschericia coli*, *Listeria monocytogenes* dan *Salmonella thypi*. Menurut Lindberg, 1973 pada anggota *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* dan *Citrobacter* umumnya memiliki rantai samping polisakarida yang terdiri dari oligosakarida yang terpolimerisasi berulang, membawa spesifitas terhadap O-antigen yang terhubung oleh ikatan kovalen dengan inti oligosakarida. O-antigen tersebut merupakan salah satu reseptor yang dimiliki oleh bakteri Gram negatif.

Banyaknya bakteri patogen yang mampu dihambat pertumbuhannya oleh Φ LA-1 menunjukkan bahwa Φ LA-1 merupakan *polyvalent bacteriophage*. Menurut Bronfenbrenner (1993), *polyvalence* dideskripsikan sebagai kemampuan litik bakteriofag terhadap lebih dari satu sel inang. Kemampuan ini didukung dengan adanya kesesuaian antara reseptor inang dengan antireseptor pada virus sehingga terjadi ikatan spesifik. Dengan demikian dapat disimpulkan



Gambar 5. Φ LA-1 efektif menghambat pertumbuhan a) *Shigella flexneri*, b) *Shigella dysentri*, c) *Eschericia coli*, d) *Listeria monocytogenes*, e) *Salmonella thypi* dan tidak efektif menghambat pertumbuhan f) *Staphylococcus aureus*, g) *Bacillus cereus*, h) *Lactobacillus plantarum*



Gambar 6. Spektrum penghambatan Φ LA-1 a) *Shigella flexneri*, b) *Shigella dysentri*, c) *Escherichia coli*, d) *Listeria monocytogenes*, e) *Salmonella thypi*, f) *Staphylococcus aureus*, g) *Bacillus cereus*, c) *Lactobacillus plantarum*

bahwa molekul reseptor pada *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* sama sehingga dapat berikatan spesifik dengan antiresptor pada Φ U14. Walaupun *polyvalence* relatif jarang namun dilaporkan ada beberapa famili bakteri yang dapat diserang oleh *polyvalence phage* diantaranya adalah *Enterobacteraceae* (Bertani *et al.*, 1967), *Pseudomonadaceae* (Billing, 1963;

Crosse dan Garrett, 1963) dan *Actinomycetaceae* (Bradley dan Anderson, 1968), yang termasuk ke dalam famili *Enterobactericeaceae* adalah *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Serratia* (Bayer, 1968).

Lebih lanjut, pada Gambar 5 menunjukkan adanya bakteri target yang tidak dapat dilisiskan oleh Φ LA-1 yaitu

a) *Staphylococcus aureus*, b) *Bacillus cereus* dan c) *Lactobacillus plantarum*. Hal ini dapat ditunjukkan dengan tidak adanya *plaque* yang terbentuk namun hanya terdapat bakteri target yang tumbuh. Ketidakmampuan Φ LA-1 dalam melisis bakteri patogen dapat disebabkan karena reseptor dari bakteri patogen tidak sesuai dengan reseptor Φ LA-1. Anggota *Staphylococcus* dan *Bacillus* memiliki *teichoic acid* dan *glycopeptides*, molekul tersebut membuat bakteriofag tidak dapat melakukan infeksi karena bakteri tersebut menjadi resisten (Lindberg, 1973)

Aktivitas penghambatan Φ LA-1 terhadap bakteri patogen dan non-patogen berdasarkan pengamatan nilai absorbansi jumlah sel bakteri target pada 600 nm (Bicalho et al., 2009)

Pelisisan Φ LA-1 terhadap bakteri target diindikasikan dengan menurunnya nilai absorbansi jumlah sel target pada media tumbuh akibat infeksi *phage* (Gambar 6).

Gambar 6 menunjukkan bahwa Φ LA-1 memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Eschericia coli*, *Listeria monocytogenes* dan *Salmonella thypi*. Penghambatan oleh Φ U14 ditunjukkan dengan menurunnya nilai absorbansi pada media tumbuh, misalnya nilai absorbansi pada perlakuan *Shigella flexneri* tanpa penambahan *phage lysate* adalah 0.756 sedangkan pada perlakuan *Shigella flexneri* dengan penambahan *phage lysate* adalah 0.535, kondisi ini terjadi setelah 8 jam pengamatan. Penurunan ini disebabkan oleh lisisnya sebagian strain bakteri patogen. Lisisnya bakteri patogen disebabkan bakteri patogen tersebut memiliki reseptor yang sesuai dengan reseptor Φ U14. Kesesuaian ini mengakibatkan Φ U14 mampu memasukkan materi genetiknya ke dalam bakteri patogen tersebut dan menggunakannya untuk berkembangbiakan. Bakteriofag hanya dapat memasuki membran sel bakteri apabila reseptor alami sel bakteri tersebut sesuai dengan reseptor bakteriofag (Mayer, 2010).

Lebih lanjut, tidak semua bakteri target dalam media mampu dilisis oleh Φ LA-1, hal ini terbukti dari masih tingginya nilai absorbansi pada media pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Lactobacillus plantarum* (Gambar 6). Misalnya nilai absorbansi pada perlakuan *Staphylococcus aureus* tanpa penambahan *phage lysate* adalah 0.598 sedangkan *Staphylococcus aureus* dengan penambahan *phage lysate* sebesar 0.675, ini

terjadi setelah 8 jam pengamatan. Hal ini menunjukkan bahwa Φ LA-1 tidak dapat melisis *Staphylococcus aureus* karena reseptornya tidak sesuai dengan reseptor Φ LA-1, akibatnya *Staphylococcus aureus* tidak dapat dihambat Φ LA-1 dan masih dapat tumbuh.

SIMPULAN

Dari hasil purifikasi, diperoleh Φ LA-1 yang merupakan bakteriofag murni, terbukti dengan terbentuknya morfologi *plaque* yang seragam dan terdapatnya satu *band* yang muncul ketika dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa yaitu sebesar 21226 bp, dengan nilai kemurnian 1.73. Hasil pelisisan Φ LA-1 terhadap bakteri patogen dan non-patogen yang dilakukan berdasarkan *plaque* yang terbentuk dan pengamatan nilai absorbansi jumlah sel bakteri target pada 600 nm diketahui bahwa Φ LA-1 memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Shigella flexneri*, *Shigella dysentri*, *Listeria monocytogenes*, *Eschericia coli* dan *Salmonella typhimurium* akan tetapi tidak dapat menghambat *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Lactobacillus plantarum*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams MH. 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers, London, United Kingdom
- Bacon RT, Belk KE, Sofos JN, Clayton RP, Reagan JO, and Smith GC, 2000. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. *J. Food Prot.* 63(8): 1080-1086
- Bayer ME. 1968. Adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of *Eschericia coli*. *Journal of Virology.* 2: 346-56
- Bertani G, Tornheim B, and Laurent T. 1967. Multiplication in *Serratia* of a bacteriophage originating from *Escherichia coli*: lysogenization and host-controlled variation. *Journal of Virology.* 32: 619-632
- Bicalho RC, Santos TMA, Gilbert RO, Caixeta LS, Taixeira LM, Bicalho MLS, and Machado VS. 2009. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of post-partum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part I: Isolation and lytic activity estimation of bacteriophages. *J. Dairy Science.* 93: 93-104

- Billing E. 1963. The value of phage sensitivity tests for the identification of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Bacteriol.* 26:193-210
- Bradley SG and Anderson DL. 1968. Phylogeny of actinomycetes as revealed by susceptibility to actinophage. *J. Ind. Microbiol.* 2: 223-229
- Bronfenbrenner J. 1933. True polyvalence of Pure bacteriophages. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 30: 729-732
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Foodborne Illness. Dilihat 4 Mei 2011. <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections.t.htm>>.
- Comeau AM, Chan AM, and Suttle CA. 2006. Genetic richness of vibriophages isolated in a coastal environment. *Environ. Microbiol.* 8: 1164-1176
- Crosse JE, and Garrett CME. 1963. Studies on the bacteriophagy of *Pseudomonas morsprunorum*. Ps. sy ringe, and related organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 159-177
- Dillon A, and Parry JD. 2007. Characterization of temperate cyanophages active against freshwater phycocyanin-rich *Synechococcus* species. *Freshw. Biol.* 53(6): 1253-1261.
- Ellis CB. 2007. Isolation of Potential MS2 Bacteriophage Strain. *The University of Alabama McNair Journal*. p. 13-23
- Holmfeldt K, Middelboe M, Nybroe O, and Riemann L. 2007. Large variability in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their *Flavobacterium* hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6730-6739.
- Horcasidas JA, Meijer WJJ, Rojo F, and Salas M. 2001. Analysis of early promoters of the *Bacillus* bacteriophage GA-1. *Journal of Bacteriology*. p: 6965-6970
- Hudson JA, Billington C, and Bigwood T. 2006. Phage Inactivation of Foodborne Bacteria. *Food Australia* 58: 593-595
- Kapil A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian Journal of Medical Research*. 121: 83-91
- Leuschner RGK, Arendt EK, and Hammes WP. 1993. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 617-621
- Lindberg AA. 1973. *Bacteriophage Receptors*. Department of Bacteriology, National Bacteriological Laboratory, Stockholm, Sweden
- Litbangkes. 2007. Riset Kesehatan Dasar. Dilihat 26 April 2011. <www.depkes.go.id>.
- Lu Z, Breidt Jr F, Fleming HP, Altermann E, dan Klaenhammer TR. 2003. Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, ΦJL-1, From Cucumber Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 225-235
- Mayer G. 2010. *Bacteriology. Chapter Seven: Bacteriophage* The Board of Trustees of The University of South Carolina. Dilihat 20 April 2011. <<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>>.
- Nurrizkiawan Z. 2010. Isolasi Bakteriofag dan Aplikasinya dalam Mengendalikan Bakteri Patogen untuk Meningkatkan Keamanan Pangan. Skripsi. Teknologi Hasil Pertanian, FTP-UB
- Oliveira A, Sillankorva S, Quinta R, Henriques A, Sereno R, and Azeredo J. 2009. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 1919-1927
- Omnilytics. 2006. What makes bacteriophage safe?. Dilihat 25 April 2011. <<http://www.omnilytics.com/documents/WhatMakes%20Bacteriophage%20Safe.pdf>>.
- Rakhuba DV, Kolomiets EI, Szwajcer DE, Novik GI. 2010. Bacteriophage receptors, Mechanism of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*. 59(3): 145-155
- Sambrook, Fritsch and Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Volume 1, chapter 2. Cold Spring Harbor Press, NY
- Snyder L, and Champness W. 2003. Lytic bacteriophages: genetic analysis and transduction. In: *Molecular Genetics of Bacteria*. Washington, DC: ASM Press, p: 231-274
- Sofos JN and Smith GC, 1998. Nonacid meat decontamination technologies: model studies and commercial applications. *Int. J. Food Microbiol.* 44 (3): 171-188
- Stenholm AR, Dalsgaard I, and Middelboe M. 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4070-4078
- United States Food and Drug Administration. 2006. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000198. Dilihat 24 April 2011. <www.FDA.gov>
- World Health Organization. 2010. Antimicrobial Resistance. Dilihat 20 April 2011. <www.WHO.int>.