

FAG *Salmonella* ASAL LIMBAH PASAR IKAN DAN AIR SUNGAI DI SEKITAR KAMPUS UNIVERSITAS BANGKA BELITUNG

Rizky Putri Deshanda^{1*}, Rahmad Lingga¹, Nur Annis Hidayati¹, Eka Sari¹, Rossy Hertati²

¹Jurusan Biologi, Universitas Bangka Belitung, Bangka, Indonesia

*Corresponding author: rizkydeshanda96@gmail.com

²Balai Pengawasan Obat dan Makanan, Pangkalpinang, Indonesia

ABSTRACT

Seven *Salmonella* lytic phages found in water sample of river near UBB campus building. Phages were characterized by plaque morphology (plaque diameter size and shape) and phage host range. Phages formed plaques with diameter size ranges from 1.06 mm to 4.90 mm, and form shape such as small dot, circle, elongated, or irregular. Factors effect plaque forming by phages are phage titer number and incubation time. All phage isolates have broad host range include Gram negative and positive. Six phage isolates are able to lyse *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*, meanwhile one phage isolate is able to lyse *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Bacteriophage, *Salmonella*, isolation, characterization

PENDAHULUAN

Kontaminasi *Salmonella* dapat disebabkan oleh rendahnya sanitasi pada penanganan pangan. Ikan yang dijual di pasar tradisional dapat mengalami kontaminasi bakteri *Salmonella* dari berbagai sumber. Salah satu sumber kontaminasi *Salmonella* adalah air yang biasanya digunakan oleh para pedagang untuk membuat ikan tetap segar. Air yang menggenangi meja-meja tempat ikan dijajakan diduga mengandung banyak jenis bakteri karena kurangnya sanitasi yang kemudian dapat menyebabkan kontaminasi terhadap pangan.

Kontaminasi *Salmonella* pada pangan menyebabkan infeksi serius pada manusia yang disebut sebagai Salmonellosis. Salmonellosis dapat menimbulkan infeksi serius bagi manusia dan melemahkan sistem kekebalan pada anak-anak, wanita tua dan hamil (*Multi Cultural Health Communication*, 2011). Penurunan paparan *Salmonella* harus dilakukan untuk mengurangi kasus terjangkitnya penyakit Salmonellosis. Beberapa metode pencegahan kontaminasi *Salmonella* dapat dilakukan seperti penurunan suhu dengan pemberian es atau penggunaan bahan pengawet. Namun demikian, keamanan pangan akibat penamabahan es dan pengawet masih disangsikan, sehingga diperlukan metode alternatif. Bahan-bahan alami dibutuhkan sebagai alternatif dalam menurunkan cemaran *Salmonella*. Salah satu alternatif bahan alami yang aman digunakan adalah penggunaan Bakteriofag.

Bakteriofag merupakan virus yang bersifat parasit pada bakteri. Bakteriofag dapat menyebabkan kerusakan total terhadap bakteri dengan cara melisis bakteri inang (College, 2003). Oleh sebab

itu, Bakteriofag dapat digunakan sebagai agen hayati (biokontrol) bakteri yang ramah lingkungan (Vaks & Benhar, 2011). Bakteriofag juga telah dimanfaatkan sebagai alternatif dalam pengendalian kontaminasi *Salmonella* serovar enteritidis dan *typhimurium* pada makanan siap saji, ternak, buah dan sayuran (Kang *et al.*, 2013). Menurut McCallin *et al.*, 2013), terapi Bakteriofag secara oral pada manusia dinyatakan aman.

Bakteriofag belum tersedia secara komersial di Indonesia, sehingga penelitian terkait bakteriofag sangat diperlukan. Penelitian Bakteriofag yang telah dilakukan seperti isolasi, spesifitas, karakterisasi dan keamanan Bakteriofag. Bakteriofag hanya melisis bakteri target, sehingga Bakteriofag untuk melisis *Salmonella* sp. dapat diperoleh dari isolasi Bakteriofag yang berasal dari media yang terkontaminasi bakteri *Salmonella* sp. (Atterbury *et al.*, 2007).

Penelitian Bakteriofag di Indonesia tidak diiringi pemanfaatannya pada pangan dan lingkungan secara komersial. Pemanfaatan Bakteriofag *Salmonella* secara komersial memerlukan penelitian tentang isolasi dan pemanfaatan Bakteriofag. Air bekas ikan di pasar yang diduga mengandung banyak bakteri *Salmonella* dapat dijadikan sumber isolasi Bakteriofag, mengingat Bakteriofag banyak ditemukan pada tempat yang banyak terdapat bakteri ianangnya. Berdasarkan uraian diatas, proposal ini disusun untuk melaksanakan penelitian isolasi Bakteriofag dari air bekas ikan di pasar sebagai biokontrol dalam menurunkan *Salmonella*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menurunkan cemaran *Salmonella*.

METODE PENELITIAN

Filtrasi Sampel

Sebanyak lima mL sampel air bekas ikan disentrifugasi dengan menggunakan *sentrifuge* pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit sebanyak tiga kali. Sebanyak tiga hingga empat mL supernatan yang terbentuk diambil dengan *syringe* dan difiltrasi dengan membran filter *milipore* 0,22 μm . Supernatan yang telah difiltrasi dimasukkan ke dalam tabung steril.

Sebanyak sepuluh Ose biakan bakteri *Salmonella* dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* berisi lima mL media NB. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil filter fag ditambahkan ke dalam biakan. Sebanyak sembilan mL biakan tersebut kemudian diambil dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit sebanyak tiga kali. Supernatan yang terbentuk diambil dengan *syringe* sebanyak dan difiltrasi dengan membran filter *milipore* 0,22 μm . Hasil filtrasi dimasukkan ke dalam tabung steril.

Pencawanan

Biakan bakteri *Salmonella* dalam media NB disiapkan. Sebanyak satu mL hasil filtrasi fag diencerkan ke dalam sembilan mL NaCl fisiologis 0,9% hingga diperoleh pengenceran 10^{-3} . Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0,2 μL untuk dicampurkan ke dalam biakan bakteri pada tiga *Erlenmeyer* yang berbeda. Campuran dipindahkan ke dalam *microtube* dan diinkubasi ke dalam *waterbath shaker* selama 15 menit pada suhu 37 °C. Sebanyak 100 μL campuran yang telah diinkubasi dimasukkan ke dalam *soft agar* (NB yang mengandung 0,7 % agar) sebanyak 5 mL yang bersuhu 47°C kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, selanjutnya dituang pada media NA padat. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian pembentukan plak diamati. Parameter pengamatan meliputi karakteristik plak yaitu ukuran dan bentuk tepi plak.

Pemurnian Fag

Plak dipindahkan dengan menggunakan pipet *Pasteur* kemudian plak tersebut dicampurkan dengan SM Buffer. Suspensi fag *divortex* dan dibiarkan selama 5-10 menit pada suhu ruang. Suspensi tersebut kemudian di sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm, selama 20 menit sebanyak 2 kali ulangan. Supernatan difiltrasi menggunakan membran filter *milipore* 0.22 μm , kemudian supernatan disimpan untuk stok atau bahan produksi.

Uji Kisaran Inang

Uji kisaran inang bertujuan untuk menguji spesivitas dari fag yang berhasil diisolasi. Uji dilakukan pada dua jenis bakteri berbeda yaitu *Shigella* dan *Escherichia coli*. Prinsip kerja dari uji kisaran inang menggunakan metode *double layer agar*. Keberhasilan fag dalam melisis bakteri ditunjukkan oleh terbentuknya plak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Isolasi bakteriofag dilakukan pada tiga sampel air yaitu sampel air limbah ikan pasar Pagi Pangkalpinang dan sampel air sungai sekitar kampus UBB. Isolat Bakteriofag hanya ditemukan dari sampel air sungai sekitar kampus UBB. Isolat fag yang didapat ditandai dengan terbentuknya plak. Plak merupakan zona bening yang terbentuk oleh setiap isolat bakteriofag. Mekanisme pembentukan plak diawali oleh sebuah fag yang menginfeksi dan melisiskan satu sel bakteri inang. Fag yang baru kemudian dilepaskan keluar dari sel yang telah mengalami lisis. Fag-fag ini kemudian menginfeksi sel bakteri inang di sekitarnya dan siklus ini terus berulang, sehingga sel-sel bakteri inang di sekitar partikel fag awal terus mengalami lisis dan terbentuklah plak. Jenis fag yang berbeda juga akan membentuk plak dengan ukuran dan bentuk tepi yang berbeda-beda.

Tabel 1. Hasil karakterisasi dan purifikasi isolat fag *Salmonella*

No.	Isolat Bakteriofag	Ukuran Plak (mm)	Ciri Morfologis		
			Bentuk	Tepi	Warna
1	E1	4,9	Irregular (tak beraturan)	bergelombang	transparan
2	E2	4,84	Irregular (tak beraturan)	bergelombang	transparan
3	F1	1,06	Berupa titik-titik berkelompok	rata	transparan
4	F2	2,5	Berupa bercak-bercak memanjang	rata	transparan
5	F3	1,06	Berupa titik-titik	rata	transparan
6	H1	5	Bulat	rata	transparan
7	H3	1,9	Bulat	berlekuk	agak transparan

Karakterisasi Fag *Salmonella*

Karakteristik plak dilakukan dengan mengukur diameter plak serta ciri morfologis dari plak tersebut.

Berdasarkan perbedaan karakteristik plak yang terbentuk, isolat bakteriofag dibagi menjadi tujuh jenis fag. Ukuran rata-rata diameter plak berkisar

antara 1,06 hingga 4,90 mm. Aktivitas lisis yang terbentuk dibedakan menjadi 3 macam bentuk plak yaitu plak berbentuk bulat, irregular, memanjang dan titik-titik atau bercak kecil. Plak dengan beragam bentuk tersebut juga memiliki tepi yang rata, berlekuk, atau bergelombang. Transparansi dari setiap plak juga berbeda, terdapat plak yang jelas bening atau transparan, namun ada juga plak yang agak bening, agak keruh, dan *holozone*. Plak *holozone* memiliki transparansi yang berbeda dalam satu plak yang sama seperti bagian tengah transparan namun bagian tepi agak keruh, ataupun sebaliknya. Hal ini dapat diakibatkan oleh aktivitas lisis yang tidak merata atau berbeda-beda. Isolat fag yang diberi kode F1 dan F3 memiliki ukuran sangat kecil yaitu 1,06 mm dengan bentuk titik-titik. Meskipun memiliki ukuran diameter dan bentuk plak yang sama namun kedua jenis isolat plak ini dibedakan berdasarkan persebaran plak. Fag F1 memiliki plak yang berupa titik-titik berkelompok sehingga tampak dalam beberapa kelompok-kelompok plak, sedangkan plak dari fag F3 berupa titik-titik dengan persebaran yang merata. Fag F2 juga memiliki plak yang berukuran kecil namun sedikit lebih besar dibandingkan plak F1 dan F3 yang berupa titik-titik,

sehingga lebih menyerupai bercak-bercak dengan diameter 2,50 mm. Fag H1 memiliki plak dengan ukuran yang paling besar yaitu 5,00 mm dengan bentuk bulat dan tampak bening atau transparan. Fag H3 memiliki plak yang berukuran 1,90 mm dengan bentuk bulat dengan tepi yang tidak rata namun agak transparan. Fag E1 dan E2 memiliki bentuk yang sama yaitu irregular atau tidak beraturan, transparan, dan tepi yang bergelombang, namun keduanya memiliki ukuran diameter yang berbeda. Keduanya mempunyai ukuran diameter yang cukup besar yaitu fag E1 dengan plak berdiameter 4,90 mm dan fag E2 dengan plak berdiameter 4,90 mm.

Kisaran Inang Fag *Salmonella*

Tabel 2. menunjukkan kemampuan fag *Salmonella* dalam melisis bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Fag F1, F2, H1, H3, E1, E2 dapat melisis kedua bakteri inang, sedangkan fag F2 hanya mampu melisis bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa 6 dari 7 jenis fag *Salmonella* yang ditemukan, memiliki kisaran inang yang luas termasuk bakteri dari Gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan Gram negatif (*Escherichia coli*).

Tabel 2. Hasil uji kisaran inang fag *Salmonella* terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Isolat Bakteriofag	Kemampuan melisis bakteri inang	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
F1	+	+
F2	+	+
F3	-	+
H1	+	+
H3	+	+
E1	+	+
E2	+	+

Pembahasan

Perbedaan ukuran plak yang terbentuk dapat disebabkan oleh perbedaan waktu adsorpsi. Perlambatan adsorpsi dapat mengakibatkan rendahnya laju adsorpsi dan menghasilkan ukuran plak yang lebih kecil (Abedon *et al.*, 2001). Ukuran plak dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti waktu inkubasi, konsentrasi agar, kondisi inkubasi, dan fase log sel bakteri inang (Clokie & Kropinski, 2009).

Waktu inkubasi dapat memberikan pengaruh terhadap pembentukan plak. Hal ini dikarenakan beberapa fag hanya akan membentuk plak apabila sel bakteri inang telah mencapai fase tertentu. Fase logaritmik dan stasioner merupakan fase yang paling sering untuk digunakan dalam pengujian fag serta pembentukan plaknya. Sebagian besar fag membutuhkan fase logaritmik inangnya untuk membentuk plak, namun sebagian lain membutuhkan fase stasioner. Lowrie (1974) menyatakan bahwa fase stasioner akhir *Lactococcus lactis* dibutuhkan untuk pembentukan plak dari fagnya yaitu fag r1t,

sedangkan pada fase logaritmik, tidak terjadi pembentukan plak. Fase tertentu yang dibutuhkan fag untuk membentuk plak tersebut akan dicapai selama periode waktu inkubasi yang berbeda-beda tergantung jenis bakteri inang dari fag.

Uji kisaran inang menunjukkan kemampuan fag tersebut dalam menginfeksi dan melisis berbagai jenis bakteri inang. Sebagian jenis fag mampu menginfeksi banyak jenis bakteri sedangkan sebagian fag hanya mampu melisis jenis bakteri tertentu. Spesifikasi interaksi antara fag dengan bakteri inang ditentukan oleh spesivitas dari adsorpsi dan bergantung pada struktur pada permukaan sel bakteri (Braun & Hantke, 1997). Reseptor fag merupakan komposisi dari sel inang dan struktur permukaan selnya. Sebagian besar fag menggunakan pili, flagella, polisakarida kapsular dan polisakarida lendir dari sel bakteri sebagai reseptor. Beberapa jenis fag yang melakukan adsorpsi melalui flagella bakteri inang diantaranya adalah fag \times yang mampu menginfeksi bakteri *Salmonella*, *Serratia*, dan

Escherichia coli, serta fag PBS7 yang hanya spesifik terhadap bakteri *Bacillus pumilus*.

Fag menghasilkan protein-protein tertentu yang berguna untuk menginfeksi sel bakteri inang. Salah Beberapa contoh protein yang dihasilkan oleh fag litik adalah Lisin (Borysowski *et al.*, 2006), Hollin, dan Endolisin (Hanlon, 2007). Borysowski *et al.*, (2006) menyatakan bahwa Lisin merupakan enzim yang dihasilkan oleh fag litik yang mampu mendegradasi dinding sel bakteri dengan cara menyerang ikatan peptidoglikan. Kemampuan ini menyebabkan fag yang menghasilkan Lisin dapat dengan efektif melisiskan bakteri Gram positif, dikarenakan dinding selnya yang mengandung lebih banyak peptidoglikan. Beberapa fag litik juga dapat menghasilkan Holin dan Endolisin untuk mendegradasi dinding sel bakteri (Hanlon, 2007). Holin bekerja dengan cara melubangi membran sel inang dan Endolisin menghancurkan struktur peptidoglikan.

Fag harus melakukan adsorpsi ke permukaan sel inang guna melakukan infeksi. Fag kemudian melakukan penetrasi terhadap dinding sel bakteri dan menginjeksi materi genetiknya ke dalam sel inang. Mekanisme yang digunakan fag untuk menginisiasi koneksi menuju sel bakteri inang hingga injeksi materi genetik bergantung pada struktur fag yang disebut "ekor" (*tail*). Ackermann and Prangishvili (2012) menyatakan bahwa 91% dari 6200 fag yang berhasil diamati pada mikroskop elektron termasuk ke dalam kelompok *Caudovirales* (diantaranya *Siphophages*, *Myophages*, dan *Podophages*). Struktur *tail* dari fag sangat bermacam-macam mulai dari struktur *tail* sederhana hingga struktur yang kompleks. Struktur yang berfungsi pengenalan sel inang terletak pada ujung *tail* dari fag dan hal ini berhubungan dengan mekanisme strategi adsorpsi fag terhadap sel inang (Veesler & Cambillau, 2011; Fokine & Rossmann, 2014). Protein-protein dari *tail* fag tersebut sangat beragam dan mampu mengenali hampir setiap komponen permukaan sel bakteri inang (termasuk permukaan sel dengan komponen protein, polisakarida, dan lipopolisakarida) (Lindberg, 1973).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa 7 jenis fag litik *Salmonella* berhasil diisolasi dari air sungai sekitar kampus UBB. Pembagian jenis fag didasarkan pada karakterisasi ukuran diameter dan bentuk morfologi plak yang terbentuk, dengan kisaran ukuran mulai dari 1,06 mm hingga 4,90 mm, serta bentuk berupa titik-titik, bulatan, memanjang, dan irregular. Salah satu faktor yang mempengaruhi pembentukan plak dari fag yaitu jumlah awal fag pada sampel dan waktu inkubasi. Hanya sebagian isolat fag yang bertahan dan dapat digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat fag F1, F2, F3, H1, H3, E1, dan E3. Fag *Salmonella* memiliki kisaran inang yang luas baik bakteri Gram negatif maupun Gram positif. Fag F1, F2, H1, H3, E1, dan E2 mampu melisiskan ketiga jenis bakteri inang yaitu

Salmonella, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*, sedangkan fag F3 hanya melisiskan bakteri *Salmonella* dan *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackermann, H. 2012. Bacteriophage Electron Microscopy. *Advances in Virus Research* 82:1-32.
- Atterbury, R.J. 2007. Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 73(14): 4543-4549.
- Borysowski, J., Gorski, A., and Weber-Dabrowska., B. 2006. Bacteriophage Endolysins as A Novel Class of Antibacterial Agents. *Experimental Biology and Medicine* 231(4):366-377.
- Braun, V and Hantke, K. 1997. Receptor-mediated bacterial iron transport. Di dalam: Winkelmann G, Carrano CJ, editor. *Transition Metals in Microbial Metabolism*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 81-116.
- College, D. 2003. *Molecular Tool: Plasmids and Phages Combine For Bluescript*. <http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/keogh/plasmids.html> [20 September 2017].
- Fokine, A. and Rossmann, M.G. 2014. *Common Evolutionary Origin of Procapsid Proteases, Phage Tail Tubes, and Tubes of Bacterial Type IV Secretion Systems*. Cambridge: Elsevier Inc. Cell Press.
- Hanlon, G.W. 2007. Bacteriophages: An appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30(2):118-128.
- Kang, H., Kim J., Jung T. and Woo, G. 2013. WKSL3, A New Biocontrol Agent For *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Typhimurium in Foods: Characterization, Application, Sequence Analysis, and Oral Acute Toxicity Study. *Applied and Environmental Microbiology* 79(6): 1956-1968.
- Kropinski, A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E. and Johnson R.P. 2009. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. Bacteriophages. . Di dalam: Clokie MR, Kropinski AM, editor. *Bacteriophages: Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press.
- Lindberg, A.A. 1973. Bacteriophage Receptors. *Ann. Rev. Microbiol* 27: 205-241.
- Lowrie, R.J. 1974. Lysogenic Strains of Group N Lactic Streptococci. *Appl. Microbiol.* 27(1): 210-217.
- McCallin S., Sarker S., Barretto C., Sultana S., Berger B., Huq S., Krause L., Bibiloni R., Schmitt B., Reuteler G. Brüssow H. 2013. Safety Analysis of A Russian Phage Cocktail: from Metagenomic Analysis To Oral Application in Healthy Human Subjects. *Virology* 443(2): 187-196.
- [MCHC] Multi Cultural Health Communication. 2011. Salmonellosis. *Multi Cultural Health*

Communication.<http://www.mhcs.health.nsw.gov.au/> [20 September 2017].
Vaks, L. and Benhar I. 2011. In Vivo Characteristics of Targeted Drug-carrying Filamentous Bacteriophage Nanomedicines. *Journal of Nanobiotechnology* 9(58): 1-10.
Veesler, D and Cambillau C. 2011. A Common Evolutionary Origin for Tailed-Bacteriophage

Functional Modules and Bacterial Machineries. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 75(3):423-33.