

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

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh

**AGUNG PUTRA PURWANTO  
0810910021-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**2012**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

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

oleh  
**AGUNG PUTRA PURWANTO**  
**0810910021-91**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 8 Juni 2012  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D**  
**NIP. 196712131991032001**

**Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc**  
**NIP. 198105102005011002**

**Mengetahui,**  
**Ketua Jurusan Biologi**  
**Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Widodo, S.Si, M. Si, Ph.D. Med.Sc**  
**NIP. 196205281987012001**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agung Putra Purwanto  
NIM : 0810910021-91  
Jurusan : Biologi  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Bakteriofage Litik dari Limbah Rumah Tangga terhadap *Salmonella typhi*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juni 2012

Yang menyatakan

(Agung Putra Purwanto)

0810910021-91

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# UJI AKTIVITAS BAKTERIOFAGE LITIK DARI LIMBAH RUMAH TANGGA TERHADAP *Salmonella typhi*

Agung Putra Purwanto., Tri Ardyati, Yoga Dwi Jatmiko  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya, Malang

## ABSTRAK

*Salmonella typhi* merupakan salah satu bakteri yang menjadi agen *foodborne diseases*. Bakteriofage sebagai alternatif penggunaan antibiotik 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 *S. typhi*. Bakteriofage diisolasi dari limbah rumah tangga. Selanjutnya penentuan *host range* bakteriofage terhadap bakteri patogen lain dilakukan dengan metode *spot test*. Uji aktivitas bakteriofage terhadap *S. typhi* dilakukan menggunakan metode *bacterial challenge test*. Hasil isolasi didapatkan enam isolat bakteriofage. Semua isolat bakteriofage mampu melisis sel bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium* namun tidak mampu melisis *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. Berdasarkan hasil densitas *plaque* terbanyak didapatkan tiga isolat bakteriofage yaitu B2-St, SL3-St dan S2-St. Kemampuan isolat bakteriofage B2-St dalam melisis sel *S. typhi* lebih tinggi ( $\log 6,81 \pm 0,35$  sel/ml) daripada isolat bakteriofage SL3-St ( $\log 7,39 \pm 0,31$  sel/ml) dan S2-St ( $\log 7,60 \pm 0,27$  sel/ml), secara berurutan. 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 *S. typhi*.

Kata kunci: Bakteriofage litik, limbah rumah tangga, *Salmonella typhi*

# ACTIVITY TEST OF LYTIC BACTERIOPHAGE FROM DOMESTIC WASTE WATER AGAINST *Salmonella typhi*

Agung Putra Purwanto., Tri Ardyati, Yoga Dwi Jatmiko  
Department of Biology, Faculty of Mathematic and Natural Science,  
University of Brawijaya, Malang

## ABSTRACT

*Salmonella typhi* is considered to be the one of important pathogenic bacteria that can cause food-borne diseases. The use of bacteriophae 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 *S.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 *S. typhi* has been performed by using bacterial challenge test method. The result of this research was six bacteriophages have been succesfully isolated by using double layer method. They were able to inhibit the growth of both *Eschericia 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 bacteriophage B2-St was the highest activity in inhibiting the *S. typhi* growth ( $\log 6,81 \pm 0,35$  cells/ml) compared to bacteriophage SL3-St ( $\log 7,39 \pm 0,31$  cells/ml) and S2-St ( $\log 7,60 \pm 0,27$  cells/ml), respectively. The lowest density of *S. 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 *S. typhi*.

Key word: Domestic waste water, lytic bacteriophage, *Salmonella typhi*.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah-Nya sehingga naskah skripsi ini dapat diselesaikan. Naskah skripsi ini disusun atas bantuan dari berbagai pihak, oleh sebab itu diucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D dan Bapak Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc selaku dosen pembimbing atas segala bimbingan, nasehat, dan bantuannya selama penelitian dan penulisan naskah skripsi.
2. Bapak Dr. Suharjono, M.Si dan Bapak Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si selaku dosen penguji atas saran dan kritik yang membangun guna menyempurnakan naskah skripsi ini.
3. Bapak Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D, Med.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi.
4. Bapak, Ibu, Adik dan Keluarga tercinta atas segala kasih sayang, doa, bimbingan, dukungan dan semua pengorbanannya yang tidak terhingga.
5. Ibu Nanik Dwi Rahayu selaku laboran laboratorium Mikrobiologi atas kesabarannya membantu selama penelitian.
6. Yayuk Sri Rahayu selaku rekan satu tim atas kerjasamanya selama penelitian.
7. Wulan Sari E.P., Melysa N. F., Aliyah Siti S., Viky V., Galuh Setyanto P., dan Ekwan Nofa W. atas segala bantuan dan dukungannya.
8. Teman-teman “BIG 2008” dan teman-teman “Kost-an Dewandaru Dalam No. 9” serta semua pihak lain yang turut mendukung kelancaran dan penyelesaian skripsi ini.

Naskah skripsi ini masih belum sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak sangat diharapkan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, Juni 2012  
Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR RUMUS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Tingkat Keamanan Bahan Pangan.....	4
2.2 Karakteristik dan Patogenisitas <i>Salmonella</i> sp. ....	4
2.3 Taksonomi dan Klasifikasi Virus.....	7
2.4 Karakteristik dan Tipe Bakteriofage.....	11
2.5 Peran dan Potensi Bakteriofage sebagai Biokontrol Patogen .....	13
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>17</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2 Kultur Bakteri .....	17
3.3 Isolasi Bakteriofage .....	17
3.4 Pembuatan Stok Bakteriofage.....	18
3.5 Uji Konfirmasi dan Penentuan <i>Host Range</i> Bakteriofage .....	18
3.6 Penentuan Densitas Bakteriofage .....	19
3.7 Uji Aktivitas Penghambatan Bakteriofage Litik terhadap Pertumbuhan <i>Salmonella typhi</i> .....	19
3.8 Analisis Data.....	20



<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>21</b>
4.1 Isolasi Bakteriofage .....	21
4.2 <i>Host Range</i> Bakteriofage.....	22
4.3 Densitas Bakteriofage .....	24
4.4 Aktivitas Isolat Bakteriofage terhadap Pertumbuhan <i>Salmonella typhi</i> .....	25
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>34</b>
5.1 Kesimpulan .....	34
5.2 Saran.....	34
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>35</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>39</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Klasifikasi fage berdasarkan tingkat famili .....	9
2.2 Jumlah fage yang telah diklasifikasikan .....	10
2.3 Aplikasi Bakteriofage yang telah dilaporkan .....	16
4.1 Isolasi dan konfirmasi stok bakteriofage .....	21
4.2 Uji <i>host range</i> bakteriofage .....	22
4.3 Densitas isolat bakteriofage .....	25



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Morfologi sel <i>Salmonella typhi</i> .....	5
2.2 Morfologi virus pada tingkat famili .....	8
2.3. Bakteriofage dan bagian-bagiannya .....	11
2.4. Siklus litik dan lisogenik bakteriofage.....	12
2.5 Siklus infeksi bakteriofage .....	13
2.6 Aplikasi bakteriofage di berbagai bidang .....	15
4.1 Hasil overlay bakteriofage yang menginfeksi <i>S. typhi</i> .....	22
4.2 Uji <i>host range</i> pada bakteri <i>St. Aureus</i> .....	23
4.3 Uji <i>host range</i> pada bakteri <i>E. Coli</i> .....	23
4.4 Hasil uji aktivitas bakteriofage .....	26
4.5 Pengaruh jenis fage terhadap jumlah sel <i>S. Typhi</i> .....	28
4.6 Pengaruh isolat bakteriofage B2-St tiap jam terhadap jumlah sel <i>Salmonella typhi</i> .....	29
4.7 Pengaruh isolat bakteriofage SL3-St tiap jam terhadap jumlah sel <i>Salmonella typhi</i> .....	30
4.8 Pengaruh isolat bakteriofage S2-St tiap jam terhadap jumlah sel <i>Salmonella typhi</i> .....	30
4.9 Daerah regulator pada genom virus .....	31

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan media.....	39
2. Isolasi bakteriofage terhadap <i>Salmonella</i> .....	39
3. <i>Overlay</i> isolat bakteriofage terhadap <i>Salmonella typhi</i>	40
4. Uji latex terhadap isolat <i>Salmonella typhi</i> .....	41
5. Morfologi sel isolat <i>Salmonella typhi</i> .....	41
6. Uji <i>host range</i> pada bakteri <i>Bacillus cereus</i> .....	42
7. Uji <i>host range</i> pada bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> .....	42
8. Uji <i>host range</i> pada bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> ..	42
9. Persamaan kurva standar bakteri <i>Salmonella typhi</i> .....	43
10. Perhitungan jumlah inokulum isolat bakteriofage yang dimasukkan dalam uji aktivitas bakteriofage terhadap <i>Salmonella typhi</i> .....	43
11. Uji normalitas terhadap jumlah sel <i>S. typhi</i> selama uji aktivitas bakteriofage (B2-St,SL3-St,S2-St) .....	44
12. Uji one way anova antarisolat bakteriofage B2-St,SL3-St,S2-St .....	45
13. Uji one way anova isolat bakteriofage B2-St.....	46
14. Uji one way anova isolat bakteriofage SL3-St.....	47
15. Uji one way anova isolat bakteriofage S2-St.....	48

# DAFTAR RUMUS

**Rumus**

**Halaman**

1. Perhitungan jumlah *Plaque*..... 19

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





## DAFTAR ISTILAH

<i>Agar base</i>	Media padat terletak di lapisan paling bawah dalam cawan petri
Bakteriofage	Virus yang menginfeksi dan bereplikasi dalam sel prokariotik
Bakteriofage litik	Virus yang menginfeksi sel bakteri dengan berlipat ganda sampai bakteri lisis dan membentuk bakteriofage baru
Bakteriofage lisogenik	Virus yang menginfeksi sel bakteri bakterinya namun membentuk <i>profage</i> (asam nukleat viral yang masuk ke dalam genome bakteri)
<i>Double-layer</i>	Metode dalam praktek mikrobiologi dengan cara menuang suspensi dalam suatu media semi padat ke media agar base ( <i>overlay</i> )
<i>Host range</i>	Kisaran inang
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> adalah nilai perbandingan antara jumlah bakteriofage dan bakteri uji
PFU	Kepanjangan dari <i>Plaque Forming Unit</i> . Istilah khusus yang digunakan dalam penentuan densitas suatu bakteriofage
<i>Plaque</i>	Penampakan zona bening yang menandakan adanya suatu aktivitas lisis oleh bakteriofage
<i>Spot test</i>	Metode dalam praktek mikrobiologi dengan cara kultur bakteri dalam media cair digoreskan pada media padat menggunakan cotton bud steril
<i>Top layer agar</i>	Lapisan paling atas pada suatu media padat dalam cawan petri

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

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 dan Miskiyah, 2010). Data rangkuman kasus keracunan pangan dari Direktorat Surveilans 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 6 kasus, tahun 2002 terdapat 12 kasus, tahun 2003 terdapat 9 kasus dan tahun 2004 terdapat 21 kasus (Hariyadi, 2008). Departemen Pertanian Amerika Serikat (USDA) tahun 1996 memperkirakan terjadi 4000 kematian dari 5 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*. ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) juga menyarankan bahwa keempat bakteri ini perlu mendapat perhatian khusus dalam industri pangan (Fardiaz, 1996).

Perhatian khusus terhadap beberapa bakteri patogen, terutama *Salmonella* sp. perlu dilakukan karena merupakan agen *foodborne diseases*. 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 dan Kurniawati, 2007). Marriot (1999) melaporkan bahwa *Salmonella* dapat tumbuh dan memproduksi endotoksin yang dapat menyebabkan salmonellosis yang ditandai dengan sakit perut, mual dan diare, kadang disertai demam ringan dan sakit kepala. *Salmonella* menyerang mukosa usus (saluran pencernaan), jaringan limfoid dan diteruskan ke kelenjar getah bening sehingga dapat menyebabkan gastroenteritis dan tifus (Wray, 2003).

Usaha pengendalian bakteri patogen khususnya *Salmonella typhi* diantaranya adalah dengan menggunakan senyawa antimikrobia seperti antibiotika, namun hal ini menimbulkan permasalahan baru yaitu bakteri menjadi resisten terhadap senyawa antibiotik. Selain itu, penggunaan antibiotik 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 and 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. Bakteriofage litik memiliki kemampuan menurunkan jumlah kontaminasi *Salmonella* dan *Campylobacter*, terutama untuk mengontrol *Salmonella* pada produk ternak ayam secara signifikan (Huff et al., 2005). Penggunaan bakteriofage juga dilakukan pada organisme hidup untuk terapi kesehatan pada pengendalian bakteri patogen yang terdapat di dalam saluran pencernaan hewan ternak. Di 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 *S. typhi* dan perilaku higienis yang kurang memadai (Wray, 2003). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi bakteriofage sebagai usaha alternatif pengendalian bakteri patogen terutama *S. typhi* sehingga diharapkan dapat meningkatkan keamanan pangan.



## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang ingin dikaji dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah isolat bakteriofage litik yang diperoleh mampu melisis beberapa bakteri patogen yang diujikan?
2. Bagaimana pengaruh aktivitas bakteriofage litik terhadap pertumbuhan *S. typhi*?

## 1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan isolat bakteriofage litik yang mampu melisis beberapa bakteri patogen yang diujikan.
2. Mengetahui pengaruh aktivitas bakteriofage litik terhadap pertumbuhan *S. typhi*.

## 1.5 Manfaat

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan informasi ilmiah tentang alternatif pengendalian *S. typhi* dengan menggunakan bakteriofage untuk meningkatkan keamanan pangan maupun terapi kesehatan pada ternak.
2. Mengurangi resistensi bakteri *Salmonella* terhadap antibiotik dalam suatu bahan pangan.
3. Mengurangi adanya kejadian penyakit infeksi keracunan makanan akibat kontaminasi bakteri patogen khususnya *S. typhi*.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tingkat Keamanan Bahan Pangan

Makanan yang berasal dari hewan dan tumbuhan dapat berperan sebagai media pembawa mikroorganisme penyebab penyakit keracunan pangan (*foodborne disease*) pada manusia. Kasus *foodborne disease* adalah masuknya mikroba bersama makanan yang kemudian diserap oleh tubuh manusia (Cliver, 1990). Di Indonesia, kasus keracunan pangan cukup sering terjadi dan cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 2003 dilaporkan bahwa dari 18 kasus yang tercatat, 83,3 % diduga karena bakteri patogen, sedangkan pada tahun 2004 sebanyak 60 % dari 41 kasus, dan pada tahun 2005, dari 53 kasus 72,2 % karena bakteri. Hasil penelitian pada beberapa jenis makanan menunjukkan bahwa mutu secara mikrobiologis umumnya sangat rendah. Makanan jajanan seperti gado-gado, ketoprak, dan tauge goreng mengandung bakteri coliform antara  $1 \times 10^4$  sampai  $1,7 \times 10^4$  sel/g dan coliform fekal antara  $3,6 \times 10^1$  sampai  $5,0 \times 10^3$  sel/g, selain mengandung *Salmonella*, *Shigella*, dan *Staphylococcus* (Winarti dan Miskiyah, 2010). Hal yang perlu diperhatikan tentang penyebaran keberadaan *Salmonella* dapat bersumber dan melalui beberapa hal yaitu makanan hewan ternak, tingkat kebersihan yang rendah di waktu produksi dan penjualan suatu produk pangan (Wray, 2003).

Tingkat bahaya kontaminasi bakteri *Salmonella* yang tinggi mendorong beberapa lembaga yang bergerak di bidang pangan membuat aturan sangat ketat mengenai kandungan *Salmonella*. Menurut rekomendasi ICMSF (*International Commission on Microbiological Specification for Foods*) tahun 1996, kandungan *Salmonella* harus nihil (tidak ada) dalam 25 gram sampel yang diuji. Sementara itu, menurut peraturan *Public Health Laboratory Service* tentang penilaian kualitas secara mikrobiologi, disebutkan bahwa batas aman *Salmonella* adalah tidak terdeteksi dalam 25 gram sampel pada sayuran segar.

### 2.2 Karakteristik dan Patogenisitas *Salmonella typhi*

Genus *Salmonella* adalah anggota famili *Enterobacteriaceae* yang memiliki karakter berbentuk batang (Gambar 2.1) (Todar, 2011), umumnya bersifat motil menggunakan flagel peritrik, mampu tumbuh

pada *nutrient agar*, fakultatif anaerob, mampu memfermentasi glukosa dengan menghasilkan gas, mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit, dan oksidase negatif. Klasifikasi *Salmonella* telah menjadi kontroversi selama beberapa tahun dan berdasarkan nomenklatur terkini yang menggunakan sistem taksonomi lanjut, Genus *Salmonella* dibagi menjadi dua spesies yaitu, *S. enterica* dan *S. bongori*. *Salmonella enterica* dibagi menjadi enam subspecies yaitu Subspecies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, dan *indica*. Oleh karena itu, penulisan tata nama yang benar adalah *Salmonella enterica subspecies enterica* serovar *enteritidis*. Namun beberapa lembaga penelitian masih menerapkan *Salmonella enteritidis* sebagai cara penulisan ilmiah (Wray, 2003).

Beberapa karakteristik *Salmonella* menurut Bell & Kyriakides (2002) dan Wray (2003) yaitu motil, mampu mereduksi nitrat, uji katalase positif, uji oksidase negatif, tidak mampu memproduksi indol dan menghidrolisis urea, mampu memproduksi H<sub>2</sub>S dari TSI agar, pemanfaatan sitrat sebagai sumber karbon tunggal, uji metal merah positif, uji voges-proskauer negatif, uji *lysine decarboxylase* positif, uji *ornithine decarboxylase* positif, uji *arginine dihydrolase* positif, dan reaksi *deamination of phenylalanine* negatif.



Gambar 2.1. Morfologi sel *Salmonella typhi*

Pembagian serotype *Salmonella* berhubungan dengan patogenisitas dan resistensi terhadap antibiotik. *Salmonella enterica* memiliki empat serovar yang paling sering menginfeksi manusia dan paling banyak ditemukan pada sampel makanan yaitu *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Newport*, dan *Heidelberg* (Cui, 2004). *Salmonella enterica*

*subsp. Enterica serovar Typhi* dan *Paratyphi* A, B, dan C biasanya hanya menginfeksi manusia yang dikenal dengan penyakit tifoid dan paratifoid. *S. choleraesuis*, *S. abortusovis*, *S. gallinarum/pullorum* masing-masing ditemukan pada babi, domba, dan unggas, sedangkan *S. dublin* mampu menginfeksi sapi. *S. typhimurium* dapat menginfeksi semua spesies hewan dan dikenal sebagai penyakit keracunan pangan pada manusia (Wray, 2003).

*Salmonella* merupakan salah satu bakteri patogen penyebab gastroenteritis yang ditandai dengan gejala-gejala yang umumnya tampak setelah 12-36 jam mengonsumsi bahan pangan yang tercemar. Gejala-gejala tersebut adalah diare, sakit kepala, muntah-muntah, dan demam yang berakhir selama 1-7 hari (Kompas, 2010). Menurut *Salmonella* melakukan invasi melalui membran basolateral sel epitel usus. Pada sel terjadi multiplikasi di dalam fagosom dan menyebar ke sel epitel sekitarnya. Invasi dan multiplikasi intraselluler menimbulkan reaksi inflamasi serta kematian sel epitel. Reaksi inflamasi terjadi akibat dilepaskannya mediator seperti leukotrien, interleukin, kinin, dan zat vasoaktif lain. *Salmonella* juga memproduksi toksin yang menimbulkan kerusakan sel. Proses patologis ini akan menimbulkan gejala sistemik seperti demam, nyeri perut, rasa lemah dan gejala disentri (Zein dkk, 2004).

Semua *Salmonella* berpotensi patogen, perbedaan serovar membedakan luasan *host range* dan sindrom patogen yang ditimbulkan. Beberapa serovar menunjukkan tingkat adaptasi inang yang berbeda, terutama hanya dapat menginfeksi satu spesies dari setiap hewan (Wray, 2003). *Salmonella typhi* merupakan bakteri patogen yang mempunyai kemampuan transmisi, perlekatan pada sel inang, invasi sel dan jaringan inang, dan kemampuan menghindari sistem imun inang. Saat masuk ke dalam tubuh, bakteri akan menempel atau melekat pada sel inang, tepat pada sel epitel. Bakteri *Salmonella typhi* mempunyai pili atau adhesin sebagai daya invasi untuk melekat pada reseptor sel inang. *Salmonella typhi* di usus halus melakukan penetrasi ke dalam epitel, kemudian sampai lamina propria. Endotoksin/lipopolisakarida berasal dari dinding sel dan sering dilepaskan bila bakteri lisis. Endotoksin dalam aliran darah akan terikat oleh protein yang beredar dan kemudian berinteraksi dengan reseptor pada makrofag, monosit dan sel lain dalam organ retikuloendotelial (Beswandjarum, 2011).

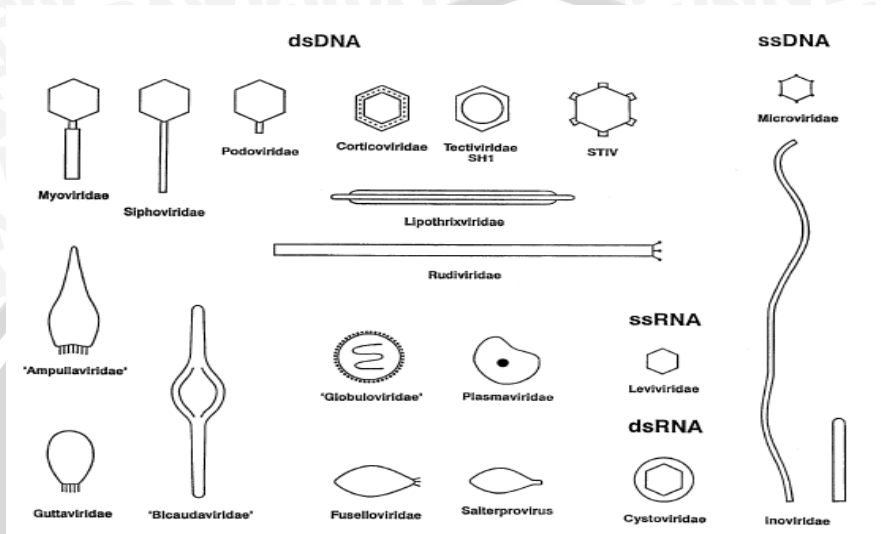


Tipus atau tifoid merupakan penyakit akut yang ditandai dengan adanya demam oleh karena infeksi bakteri *S. typhi*. Penyakit ini ditularkan melalui konsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi bakteri tersebut. Manusia dalam keadaan terinfeksi bakteri ini dapat menularkan melalui feses yang mengandung bakteri dengan konsentrasi yang tinggi. Jika feses tersebut mengenai sumber air maka manusia yang mengonsumsi air tersebut akan terinfeksi. *S. typhi* mampu bertahan dalam selokan yang kering atau dalam air selama berminggu-minggu. Penting dipahami bahwa manusia yang tidak memiliki gejala terkadang merupakan pembawa bakteri yang menjadi sumber penularan penyakit ini dan menjadi sumber pandemi (Adisasmito, 2006).

### 2.3 Taksonomi dan Klasifikasi Virus

Bakteriophage atau fage adalah virus yang menginfeksi prokariotik dan keberadaan fage sangat melimpah terutama di kawasan perairan laut. Jumlah fage diketahui terus berkembang disetiap dekade yaitu rata-rata 100 fage per tahun. Hasil survai fage pertama kali tahun 1967 ditemukan 111 fage, 99 diantaranya memiliki ekor (*tailed*). Kemudian, hasil survei terakhir tahun 2000 telah ditemukan 5.136 fage. Lebih dari 96 % fage yang ditemukan adalah fage berekor (*tailed phage*) yang diklasifikasikan dalam tiga famili yaitu *Myoviridae*, *Siphoviridae* dan *Podoviridae*. Fage berbentuk *polyhedral*, *filamentous* dan *pleomorphic* (PFP) hanya sekitar 3-4 % yang diklasifikasikan dalam 10 famili (Gambar 2.2) (Ackermann, 2006). Taksonomi virus menurut *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) tahun 2010 terbagi atas 6 ordo, 87 famili, 19 subfamili, 348 genus, dan 2285 spesies virus. Ordo virus terdiri dari Caudovirales, Herpesvirales, Mononegavirales, Nidovirales, Picornavirales, dan Tymovirales. Virus diklasifikasikan berdasarkan beberapa kriteria diantaranya adalah susunan asam nukleat: RNA atau DNA, simetris kapsid, ada atau tidak suatu *envelope*, ukuran virion dan kapsid (Microbiologybytes, 2011).





Gambar 2.2 Morfologi virus pada tingkat famili

Mikroskop elektron menjadi salah satu alat yang relevan dalam mempelajari morfologi virus sebagai karakter utama dalam penentuan klasifikasi virus, namun saat ini pembagian klasifikasi virus lebih memperhatikan pada partikel yang diinfeksi (virion) baik secara kimia atau tingkat genomik, gejala penyakit yang ditimbulkan pada inang, dan keberadaan vektor. Stabilitas virion (ditentukan oleh pH dan temperatur, paparan pelarut lipid, detergen, dan sebagainya) dan antigenisitas virion (ditentukan oleh metode serologi) juga menjadi kriteria penting dalam klasifikasi virus. Sekuen genom virus juga sudah menjadi bagian dari protokol identifikasi virus yang belum diketahui. Identifikasi virus dari ordo, famili, dan genus saat ini didasarkan pada tiga kriteria yaitu tipe dan organisasi genom virus, strategi replikasi virus, dan struktur virus (asam nukleat: DNA atau RNA) (Tabel 2.1). Selain itu, karakter yang dapat menjelaskan suatu virus diantaranya hubungan sekuen genom virus, kisaran inang, patogenisitas dan sitopatologi, mode transmisi, sifat fisika-kimia virus, dan sifat antigenik protein virus (Büchen-Osmond, 2000).

Tabel 2.1 Klasifikasi fage berdasarkan tingkat famili

Bentuk	Asam Nukleat	Kelompok virus	Keterangan	Contoh
<b>Tailed (Berekor)</b>	DNA, 2, L	<i>Myoviridae</i>	kontraktil berekor	T4
		<i>Siphoviridae</i>	berekor panjang, tidak kontraktil	$\lambda$
		<i>Podoviridae</i>	berekor pendek	T7
<b>Polihedral</b>	DNA, 1, S	<i>Microviridae</i>	Kapsomer	$\Phi$ X174
		<i>Corticoviridae</i>	kapsid kompleks, lipid	PM2
	2, L	<i>Tectiviridae</i>	inner lipid vesicle, pseudotail	PRD1
	2, L	<i>SHI*</i>	inner lipid vesicle	SHI
	2, S	<i>STV1*</i>	turret shaped protrusions	STIV
	RNA, 1, L	<i>Leviviridae</i>	seperti poliovirus	MS2
	2, L, seg.	<i>Cystoviridae</i>	envelope, lipid	$\Phi$ 6
<b>Filamen</b>	DNA, 1, S	<i>Inoviridae</i>	a. filamen panjang b. batang pendek	fd MVL 1
		<i>Lipothrixviridae</i>	envelope, lipid	TTV1
	2, L	<i>Rudoviridae</i>	seperti TMV	SIRV-1
	<b>Pleomorfik</b>	DNA, 2, S, Sh	<i>Plasmaviridae</i>	envelope, lipid, tidak berkapsid
<i>Fuselloviridae</i>			berbentuk seperti lemon	SSV1
2, L, Sh		<i>Salterprovirus</i>	berbentuk seperti lemon	His1

2, S, Sh	<i>Guttaviridae</i>	berbentuk droplet	SNDV
2, L	<i>Ampullaviridae</i> *	berbentuk botol	ABV
2, S	<i>Bicaudaviridae</i> *	Berekor dua	ATV
2, L	<i>Globaloviridae</i> *	seperti paramyxovirus	PSV

Sumber : Ackermann, 2006

Keterangan: 2 : double strand; 1 : single strand; L : linier; S : sirkular;  
Sh : superhelik; seg : segmen; \* : dalam proses menunggu klasifikasi

Hasil penelitian Smith et al. (2006) menyatakan bahwa didapatkan dua virus atau fage dari hasil isolasi suatu limbah yang mampu menginfeksi *Salmonella*. Fage FGCSSa1 diklasifikasikan ke dalam famili *Myoviridae* karena terdapatnya ekor dengan *contractile sheath* dan fage FGCSSa2 diklasifikasikan ke dalam famili *Siphoviridae* karena diindikasikan terdapatnya ekor panjang tanpa adanya *contractile sheath*.

Tabel 2.2 Jumlah fage yang telah diklasifikasikan

Filum	<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	Virus Berekor	PFV
<b>Prokariotik</b>					
<b>Arcahaea</b>	8	7		15	29
<b>Eubacteria</b>					
<b>Actinobacteria</b>	6	501	22	529	1
<b>Bacteroidetes</b>	35	23	1	59	2
<b>Chlamydia</b>					3
<b>Cyanobacteria</b>	26	7	12	45	
<b>Deinococcus-Thermus</b>	4	3		7	10
<b>Firmicutes</b>	377	1743	105	2275	33
<b>Fusobacteria</b>	3	1	3	7	
<b>α-Proteobacteria</b>	88	218	126	432	9
<b>β-Proteobacteria</b>	28	25	9	62	
<b>γ-Proteobacteria</b>	695	677	487	1859	112
<b>δ-Proteobacteria</b>	17	1	6	24	
<b>ε-Proteobacteria</b>	21	12		33	9

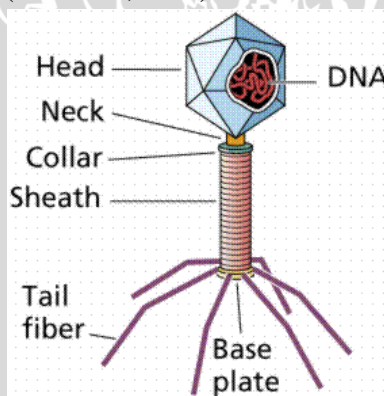
<b>Spirochaetes</b>	12	1		13	
<b>Total</b>	1320	3219	771	5360	208

Sumber : Ackermann, 2006

**Keterangan** : PFP (polihedral,filamen,pleomorfik)

## 2.4 Karakteristik dan Tipe Bakteriofage

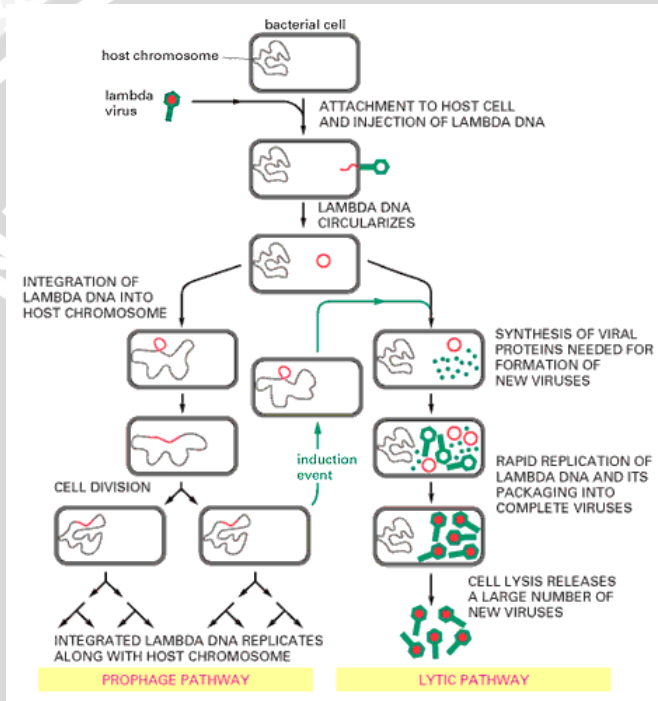
Bakteriofage ditemukan sekitar tahun 1900-an oleh Twort dan d'Herelle. Bakteriofage dapat diisolasi dari air kotor atau selokan dan tanah (Filho et al., 2007). Bakteriofage merupakan tipe virus yang memiliki protein asam nukleat yang bisa berbentuk DNA atau RNA (Gambar 2.3) (Ebi, 2011). Bakteriofage bersifat aman bagi hewan dan tumbuhan karena sifatnya sangat spesifik terhadap bakteri. Tipe umum bakteriofage adalah *virulent* (litik) dan *temperate* (lisogenik) yang memiliki siklus hidup yang berbeda (Gambar 2.4) (Alberts et al., 2004). Bakteriofage virulen mampu melisis sel bakteri dengan cara mengganggu proses metabolisme sel bakteri yang berakibat pecahnya dinding sel dan kematian sel sampai pada beberapa tahap proses. Pertama, virus akan mengenali secara spesifik reseptor di permukaan bakteri. Kemudian asam nukleat berupa DNA atau RNA diinjeksikan ke dalam bakteri. Replikasi viral terjadi di dalam bakteri. Bakteri mengalami lisis dan hancur dengan menghasilkan rata-rata 50-200 partikel virus baru (Huff et al, 2005).



Gambar 2.3 Bakteriofage dan bagian-bagiannya

Bakteriofage tipe *temperate* tidak secara langsung melakukan replikasi pada bakteri inangnya namun membentuk *profage* (asam nukleat viral yang masuk ke dalam genome bakteri) (Huff et al.,

2005). *Profage* ini menyebabkan terjadinya percampuran antara materi genetik virus dengan sel inang yang disebut transduksi (Hagens & Offerhaus, 2008). Kemudian bereplikasi panjang dan disebut strain lisogenik. Ketika bakteri lisogenik mengalami stres, *profage* menjadi aktif dan melakukan replikasi virus sehingga membunuh bakteri karena mengalami lisis (Huff et al., 2005).



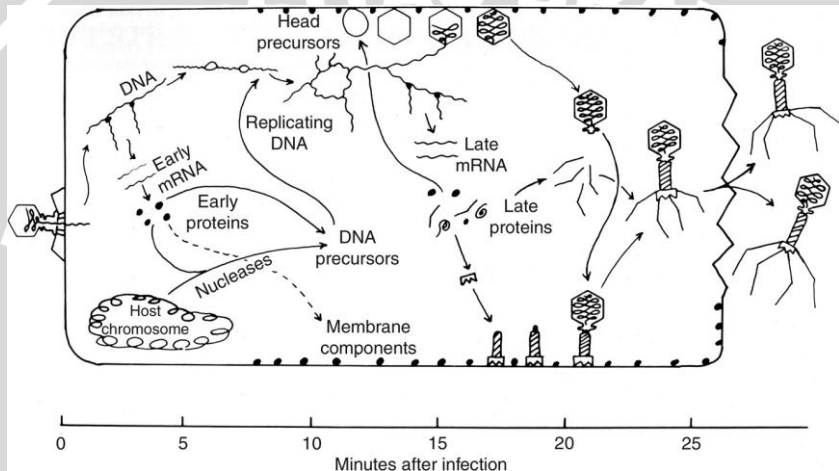
Gambar 2.4 Siklus litik dan lisogenik bakteriofage

Fage adalah bukan makhluk hidup tetapi tersusun atas materi genetika yang sederhana (DNA atau RNA) yang terbungkus oleh suatu protein atau membran pembungkus luar dan biasanya dilengkapi sebuah ekor yang mengandung sisi pengikat (*binding site*) yang spesifik pada bakteri target. Fage sangat spesifik terhadap suatu target bakteri dan hanya menginfeksi suatu jenis atau strain bakteri dan tidak memberikan dampak pada jenis sel selain bakteri, seperti sel manusia, hewan dan tumbuhan (Snyder and Champness, 2003).

Replikasi virus terdiri dari beberapa masa (Gambar 2.5) (Kutter and Sulakvelidze, 2005). Setelah virus menginfeksi sel inang,



tahap pertama disebut masa *eclipse*, dimana asam nukleat dipisahkan dari *protein coat* dan kemudian masuk dalam tahap maturasi yaitu asam nukleat virus akan diperbanyak dan dibentuk menjadi *protein coat* dalam sel inang. *Eclipse* dan maturasi disebut juga dengan *latent period*. Selanjutnya, ketika tahap maturasi berakhir, virus akan keluar dari sel yang disebut dengan lisis. Jumlah virus yang dikeluarkan saat lisis disebut *burst size*. Virus akan menginfeksi sel inang lainnya untuk terus melakukan replikasi (Madigan and Martinko, 2006).



Gambar 2.5 Siklus infeksi bakteriofage

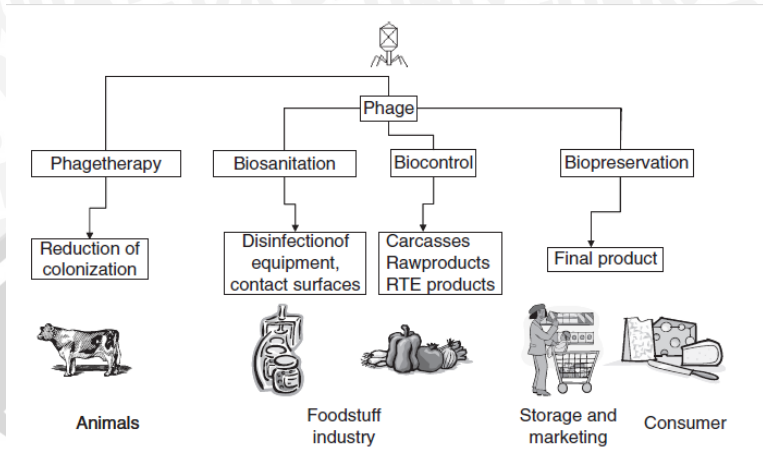
## 2.5. Peran dan Potensi Bakteriofage sebagai Biokontrol Patogen

Bakteriofage memiliki beberapa alasan aman untuk digunakan, yaitu (1) bakteriofage bekerja spesifik khususnya sel pada prokariotik sehingga tidak akan menginfeksi hewan termasuk manusia atau tumbuhan, (2) belum ditemukan kejadian efek negatif selama lebih dari 80 tahun dari studi interaksi bakteriofage dengan manusia dan hewan, dan (3) bakteriofage juga tidak mempengaruhi mikroflora dalam jumlah normal yang dapat menjadi penghambat kompetitif untuk patogen. Bakteriofage dapat menurun populasinya ketika tidak ada organisme target yang diinfeksi (Kramer and Brown, 2007).

Aplikasi bakteriofage digunakan pada pengobatan, namun kemanjuran pengobatan menunjukkan hasil yang tidak konsisten sehingga penelitian dan produk mengenai hal tersebut berhenti dalam masa perkembangan antibiotik. Namun digunakan kembali fage

karena ditemukannya banyak kasus reaksi resistensi terhadap antibiotik (Huff et al., 2005). Fage dapat digunakan secara potensial untuk menghambat penyakit pada hewan, mencegah adanya pembentukan koloni bakteri patogen pada makanan dengan menambahkan fage pada air dan makanan ternak, mengeliminasi sejumlah bakteri patogen seperti *E. coli* dan *Listeria monocytogenes*. Namun ada beberapa faktor yang dapat menghambat atau bahkan membunuh fage yaitu sinar UV, denaturasi, dan enzim proteolitik (Kramer and Brown, 2007). Selain itu, keberadaan bakteriofage dalam usus dapat meningkat atau menurun berbanding lurus dengan jumlah bakteri inang (Bielke et al., 2007).

Fage memegang peranan penting di masa depan. Hal ini disebabkan fage tidak hanya sebagai solusi untuk pengganti antibiotik namun juga berkontribusi dalam perkembangan ilmu pengetahuan. Bakteriofage telah dinyatakan lebih efektif daripada antibiotik terutama dalam mengatasi penyakit infeksi pada manusia dan hewan. Fage sangat spesifik pada suatu spesies bakteri target sedangkan target dari antibiotik merupakan bakteri patogen dan mikroflora normal. Antibiotik dan *chemotherapeutics* menyebabkan pengaruh ganda termasuk gangguan pencernaan, alergi dan infeksi sekunder, sedangkan perkembangan antibiotik baru memerlukan proses beberapa tahun, sehingga penggunaan fage dipilih sebagai alternatif baru karena mampu bekerja secara cepat dalam waktu harian atau mingguan. Biaya produksi untuk dosis terapi bakteriofage lebih murah dibandingkan dengan antibiotik. Walaupun perusahaan farmasi secara aktif melakukan perkembangan antibiotik baru namun hal ini juga diikuti oleh perkembangan bakteri yang resisten terhadap antibiotik. Sebaliknya kemampuan fage seperti pertumbuhan eksponen dan kemampuan mengatasi mutasi dan resistensi bakteri diharapkan di waktu mendatang dapat dioptimalkan sehingga terapi fage dapat menjadi cara terbaik untuk mengatasi resistensi terhadap antimikroba (Islam et al., 2005).



Gambar 2.6 Aplikasi bakteriofage di berbagai bidang

Aplikasi pemanfaatan bakteriofage sudah dilakukan di berbagai bidang (Gambar 2.6) (García et al., 2008), diantaranya bakteriofage litik yang diisolasi dari ayam, makanan ayam, dan limbah rumah tangga untuk diujicobakan pada *S. typhimurium* yang menginfeksi pada ayam. Selanjutnya bakteriofage digunakan sebagai bioterapi pada tikus yang terinfeksi *E. coli* dan pada saluran pernapasan ayam yang terinfeksi *E. coli*. Selain itu bakteriofage juga telah diaplikasikan pada beberapa bakteri patogen lain diantaranya infeksi dari *Enterococcus faecium*, *Vibrio cholera*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*. Penggunaan bakteriofage tidak hanya sebagai agen bioterapi namun juga dapat menjadi agen pengganti vaksin dan mengurangi penggunaan antibiotik (Kutter and Sulakvelidze, 2005). Menurut Leverentz et al. (2003) melaporkan bahwa hasil studi tentang pengaruh fage terhadap *Listeria monocytogenes* di buah melon menunjukkan pemberian fage dengan cara disemprotkan dapat mengurangi populasi *L. monocytogenes* dari 2,9 menjadi 4,6 log dibandingkan dengan kontrol (tanpa pemberian fage). Kemudian hasil penelitian Biswas et al. (2002) tentang pemanfaatan bakteriofage dalam mencegah bacteremia yang disebabkan *Enterococcus faecium* resisten vancomycin pada tikus. Tikus yang diinjeksikan  $10^9$  CFU/ml *E. faecium* resisten vancomycin, setelah 45 menit, diinjeksikan  $3 \times 10^9$  atau  $3 \times 10^8$  PFU/ml fage. Selama 18-24 jam, setelah perlakuan

didapatkan 50% jumlah populasi *Enterococcus faecium* resisten vancomycin mengalami penurunan.

Tabel 2.3 Aplikasi bakteriofage yang telah dilaporkan

<b>Patogen</b>	<b>Pengaruh</b>	<b>Referensi</b>
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Bakteri patogen di dalam usus Kambing berkurang dengan metode oral	Raya et al., 2006
	Bakteri patogen di dalam anus Sapi berkurang dengan aplikasi virus pada air minum	Sheng et al., 2006
<i>Salmonella</i>	Bakteri patogen pada keju berkurang dibandingkan dengan susu segar	Modi et al., 2001
	Bakteri pathogen tidak aktif pada suhu 5°C dalam daging sapi masak dan segar	Bigwood et al., 2008
<i>Campylobacter</i>	Penurunan bakteri dalam usus Ayam	Wagenaar et al., 2005
	Penurunan kontaminasi bakteri pada kulit Ayam	Atterbury et al., 2003; Goode et al., 2003
<i>Listeria monocytogenes</i>	Penurunan bakteri patogen pada potongan buah apel dan melon	Leverentz et al., 2003
	Penurunan bakteri patogen pada keju	Carlton et al., 2005
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Pertumbuhan bakteri patogen terhambat pada susu formula	Kim et al., 2007b
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fage menghambat pertumbuhan bakteri pada kelenjar susu	Gill et al., 2006a
	Fage menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam susu segar	Gill et al., 2006b; O'Flaherty et al., 2005

Sumber : García et al., 2008



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian yang berjudul “Uji Aktivitas Bakteriofage Litik dari Limbah Rumah Tangga terhadap *Salmonella typhi*” ini dilakukan pada bulan Desember 2011 – Mei 2012, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

### 3.2 Kultur Bakteri

Kultur bakteri yang digunakan sebagai inang untuk isolasi bakteriofage adalah *Salmonella enterica serotipe typhimurium* (*Salmonella typhimurium*) dan *Salmonella enterica serotipe typhi* (*Salmonella typhi*). 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.

### 3.3 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 disentrifus 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* (*S. typhi* dan *S. 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 sentrifus 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{l}$  diinokulasikan ke dalam 4 ml TSA 0,6% yang berbeda, dan dihomogenasi dengan cara dibolak-balik secara perlahan. Kemudian filtrat bakteriofage sebanyak 200  $\mu\text{l}$  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  $^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Terbentuknya *plaque* atau zona bening menandakan adanya suatu aktivitas lisis oleh bakteriofage.

### **3.4 Pembuatan Stok Bakteriofage**

*Plaque* atau zona bening pada *top layer agar* dikerok dengan menggunakan dryglasky dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang mengandung buffer SM (*salt of magnesium*) sebanyak 10 ml dan *chloroform* sebanyak dua tetes. Penambahan *chloroform* berfungsi untuk melisiskan sel inang yang tersisa agar fage dapat dikeluarkan. Kemudian suspensi dihomogenasi secara perlahan dan disentrifus pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 25  $^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit untuk memisahkan suspensi bakteriofage. Bagian supernatan diambil dan disaring menggunakan membran filter dengan diameter pori 0,45  $\mu\text{m}$  sehingga didapatkan stok bakteriofage (O'Flynn et al., 2004). Stok bakteriofage disimpan di dalam refrigerator.

### **3.5 Uji Konfirmasi dan Penentuan *Host Range* Bakteriofage**

Keberhasilan isolasi bakteriofage dikonfirmasi dengan metode *spot test* (Clokie dan Kropinski, 2009). Kultur *S. 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 1 oose dan diinokulasikan pada media TSA yang telah terdapat kultur *S. typhi*. Suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 37  $^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam dan diamati terbentuknya *plaque* atau zona bening.

Penentuan *host range* (kisaran inang) bakteriofage dilakukan pada kultur selain *Salmonella* sp. yaitu *E. coli*, *Sh. dysenteriae*, *St. aureus*, *B. cereus*, dan *S. typhimurium* dengan metode *spot test* (Clokic dan 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 1 oose dan diinokulasikan pada media TSA tersebut.. Kemudian media TSA tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Terbentuknya *plaque* atau zona bening diamati.

### 3.6 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 *S. typhi* awal fase log sebanyak 200 µl dan dihomogenisi. 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.

$$Plaque\ count = \frac{number\ of\ plaque}{dilution\ factor} \dots\dots\dots(1)$$

### 3.7 Uji Aktivitas Penghambatan Bakteriofage Litik terhadap Pertumbuhan *Salmonella Typhi*

Uji aktivitas bakteriofage terhadap *S. typhi* menggunakan metode *Bacterial Challenge Test* (O'Flynn et al., 2004). Kultur *S. typhi* sebanyak 15 ml diinokulasikan ke dalam 150 ml media TSB diinkubasi pada suhu 37 °C sampai mencapai densitas sel sebanyak  $10^6$  sel/ml. Setelah diinkubasi, kultur *S. typhi* dalam media TSB dibagi ke

beberapa Erlenmeyer (tergantung jumlah isolat bakteriofage yang diperoleh) dengan volume 50 ml. Bakteriofage ditambahkan dalam inokulum *S. typhi* dengan volume sesuai dengan rumus (Lampiran 10) sehingga diperoleh nilai *multiplicity of infection* (MOI) sebesar 50. MOI adalah perbandingan antara jumlah bakteriofage dan bakteri uji (Stephenson, 2003). Kultur *S. typhi* yang telah ditambahkan bakteriofage diinkubasi pada suhu 37 °C dalam kondisi yang sama selama 12 jam. Densitas sel *S. typhi* ditentukan dengan mengukur nilai kerapatan optik ( $\lambda$ : 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 *S. typhi* tanpa bakteriofage.

### 3.8 Analisis Data

Pengaruh jenis fage dan lama waktu inkubasi terhadap penurunan jumlah *S. typhi* dianalisis secara kuantitatif dengan analisis *One-Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *Tukey* dan *Games Howell* pada selang kepercayaan 95%. Analisis statistik data tersebut dilakukan menggunakan SPSS 15 *for Windows*.



## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi Bakteriofage

Bakteriofage diisolasi dari tiga jenis sumber yang mengandung limbah rumah tangga yaitu air sungai (DAS Brantas), *septic tank*, dan air selokan dengan menggunakan metode *overlay (double-layer method)*. Enam isolat bakteriofage telah berhasil diisolasi dari sumber-sumber tersebut (Tabel 4.1) yang dapat menginfeksi dan melisis *Salmonella* khususnya *S. typhi* dengan ditandai terbentuknya *plaque* atau zona bening (Lampiran 4). Menurut Filho et al. (2007) bakteriofage litik terhadap *Salmonella* dapat diisolasi dari limbah peternakan ayam atau limbah rumah tangga yang merupakan sumber *Salmonella* dan bakteri patogen lainnya. *Plaque* yang terbentuk memiliki karakter yang hampir sama, antara lain berbentuk bulat kecil (diameter  $\pm 0,1$  mm), merata di seluruh permukaan media namun beberapa berada di bagian tepi dari media (Gambar 4.1). Dalam penelitian Kanjana (2007) *plaque* dengan diameter besar bisa mencapai 3 mm. 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).

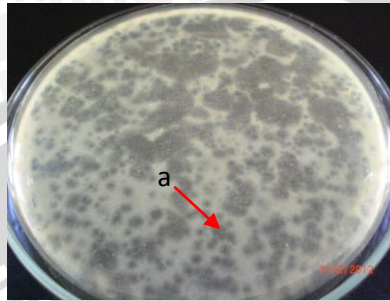
Isolat-isolat bakteriofage kemudian diperbanyak untuk stok dan selanjutnya stok bakteriofage tersebut dikonfirmasi dengan menggunakan metode *spot test*. Uji konfirmasi dilakukan untuk mengetahui viabilitas dari fage yang dijadikan stok yang telah melewati masa penyimpanan tertentu. Hasil uji konfirmasi stok bakteriofage menunjukkan terbentuknya *plaque* pada biakan *S. typhi* di cawan Petri (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Isolasi dan konfirmasi stok bakteriofage terhadap *S. typhi*

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

Ket : (+); terbentuk *plaque*  
(-); tidak terbentuk *plaque*





Gambar 4.1 Hasil overlay bakteriofage yang menginfeksi *S. typhi*  
 - a. Pembentukan plaque oleh isolat bakteriofage B3-St

#### 4.2 Host Range Bakteriofage

Tabel 4.2 Uji *host range* bakteriofage terhadap beberapa bakteri patogen

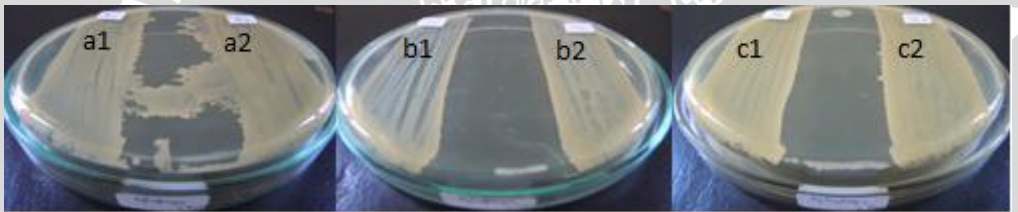
No.	Isolat	Host				
		<i>B. cereus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Sh. dysenteriae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
1	B2-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	B3-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
2	S1-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	S2-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
3	SL1-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	SL3-St	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)

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

Uji *host range* isolat bakteriofage terhadap bakteri patogen lain menggunakan metode *spot test* seperti halnya pada uji konfirmasi stok bakteriofage. Bakteri patogen yang digunakan terdiri tiga bakteri Gram negatif yang juga merupakan anggota famili Enterobacteriaceae (*Sh. dysenteriae*, *E. coli*, dan *S. typhimurium*) dan dua Gram positif (*B. cereus* dan *St. aureus*). Uji *host range* semua isolat bakteriofage menunjukkan bahwa selain mampu melisis *S. typhi*, keenam isolat bakteriofage tersebut juga mampu melisis sel *S. typhimurium*

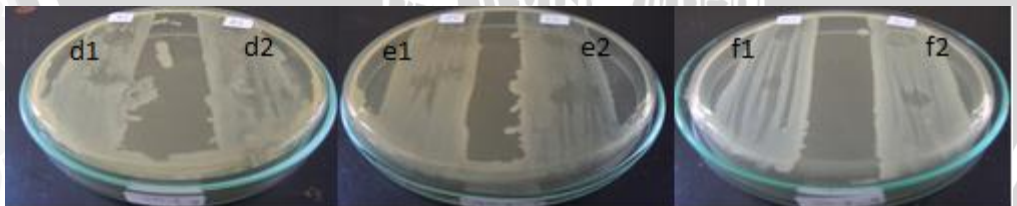


(Lampiran 8) dan *E. coli* yang ditandai dengan terbentuknya *plaque* (Gambar 9). Dengan demikian, isolat bakteriofage yang diperoleh memiliki kisaran inang yang luas. *Shigella disenteriae* dan *Salmonella* merupakan anggota kelompok Enterobactriaceae. Namun dalam uji *host range*, isolat bakteriofage yang didapat tidak mampu melisiskan *Sh. disenteriae*. Hal ini berkaitan dengan perbedaan molekul reseptor inang dan berkaitan dengan aktivitas DNA metilase sehingga *Sh. disenteriae* lebih resisten terhadap virus. 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).



Gambar 4.2 Uji *host range* pada bakteri *St. aureus*

- a1. Isolat bakteriofage B2-St; a2 Isolat bakteriofage B3-St
- b1. Isolat bakteriofage S1-St; b2 Isolat bakteriofage S2-St
- c1. Isolate bakteriofage SL1-St; c2 Isolat bakteriofage SL3-St



Gambar 4.3 Uji *host range* pada bakteri *E. coli*

- d1. Isolat bakteriofage B2-St; d2 Isolat bakteriofage B3-St
- e1. Isolat bakteriofage S1-St; e2 Isolat bakteriofage S2-St
- f1. Isolate bakteriofage SL1-St; f2 isolat bakteriofage SL3-St

### 4.3 Densitas Bakteriofage

Densitas bakteriofage ditentukan dengan menggunakan metode pengenceran bertingkat dari setiap stok bakteriofage yang diperoleh. Densitas isolat bakteriofage tertinggi adalah S2St ( $1.20 \times 10^{10}$  PFU/ml) sedangkan yang terendah adalah SL1St ( $8.10 \times 10^6$  PFU/ml) (Tabel 4.3). Densitas bakteriofage yang berasal dari *septic tank* lebih tinggi dari sumber air selokan dan sungai brantas. Hal ini disebabkan *septic tank* merupakan sumber *Salmonella* dan bakteri patogen lainnya yang jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan kedua sumber bakteriofage lainnya. Densitas isolat bakteriofage tersebut digunakan untuk menentukan volume bakteriofage dalam uji aktivitas bakteriofage terhadap pertumbuhan *S. 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 mempengaruhi jumlah fage dan proses infeksi. Replikasi fage akan terjadi apabila paling tidak terdapat 104 bakteri inang per ml. Faktor lain yang mempengaruhi jumlah dan kemampuan fage dalam perairan air tawar adalah adanya bahan organik, cahaya seperti ultraviolet, suhu, pH, konsentrasi dan tipe ion, dan aktivitas metabolisme bakteri non-inang. Keberadaan bahan organik berperan penting dalam proses replikasi fage berkaitan dengan aktivitas bakteri inang. *Salmonella typhi* mampu memproduksi jumlah fage  $10^9$ - $10^{10}$  per ml dalam suatu media laboratorium dan *septic tank*. Kation seperti kalsium dan magnesium, menginisiasi fage ketika menginfeksi bakteri inang. Contoh fage T7 dapat bertahan hidup dalam sungai, danau dan air sumur pada suhu optimal sekitar  $30^\circ\text{C}$  dan fage F-RNA memiliki densitas 105 fage per liter di danau dan sungai. Satu hal yang perlu diperhatikan bahwa kemampuan bertahan hidup dan bereplikasi fage selalu berbeda jika sumber fagenya berbeda (Grabow, 2001).

Tabel 4.3 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	$3.20 \times 10^{9*}$	

Ket: (\*) : isolat bakteriofage yang digunakan dalam uji aktivitas

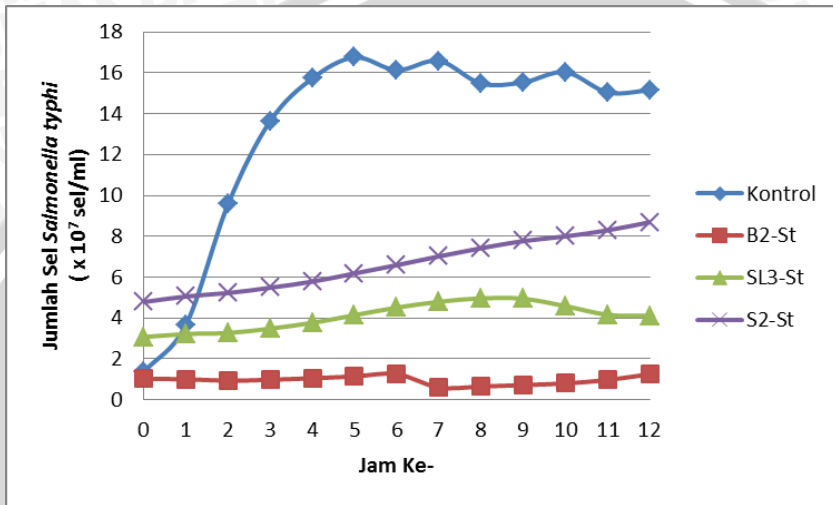
Konsep terpenting dalam perhitungan densitas virus adalah efisiensi *plating*, yaitu *plaque* yang terbentuk (*plaque-forming unit*) selalu lebih rendah daripada jumlah virus yang disuspensikan. Efisiensi virus dalam menginfeksi sel inang tidak sampai 100%. Hal ini bukan berarti virus dalam keadaan tidak aktif (tidak menginfeksi) namun bisa jadi proses infeksi oleh virus tidak dapat membentuk partikel-partikel virus. Efisiensi *plating* virus pada prokariotik selalu lebih dari 50%. Pengetahuan akan efisiensi *plating* virus dapat digunakan untuk mengukur suspensi virus yang dibutuhkan untuk mendapat jumlah *plaque* tertentu (Madigan dan Martinko, 2006).

#### 4.4 Aktivitas Isolat Bakteriofage terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*

Pengaruh penambahan isolat bakteriofage terhadap pertumbuhan *S. typhi* dilakukan dengan menggunakan metode *bacterial challenge test*. Isolat bakteriofage B2-St, SL3-St, S2-St merupakan isolat terpilih yang memiliki densitas tertinggi yang mewakili dari ketiga jenis asal sampel. Hal ini dilakukan selain agar mendapatkan nilai MOI 50 diharapkan dengan semakin tinggi densitas sel maka aktivitas penghambatannya akan semakin baik.

Dalam selang waktu 12 jam, densitas sel *S. typhi* pada inokulum perlakuan (penambahan isolat bakteriofage) menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol (tanpa bakteriofage).

Secara keseluruhan, jumlah sel *S. typhi* pada inokulum kontrol lebih banyak dibandingkan perlakuan (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Hasil uji aktivitas bakteriofage

Pemberian bakteriofage menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sel *S. typhi* akibat lisis oleh aktivitas litik bakteriofage dalam waktu tertentu. Bakteriofage B2-St merupakan fage terbaik karena dapat menurunkan jumlah sel *S. typhi* terendah dengan rata-rata log  $9,5 \times 10^6$  sel/ml (Gambar 4.4). Penurunan jumlah sel *S. typhi* 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 *S. typhi* signifikan hanya pada jam ke-0 setelah pemberian bakteriofage. Hal ini dikarenakan jumlah sel *S. typhi* awal dari ketiga inokulum berbeda namun masih berkisar  $10^6$  sel/ml. Peningkatan jumlah sel *S. typhi* terjadi secara bertahap di setiap perlakuan bakteriofage setelah mencapai titik signifikan penurunan jumlah sel *S. typhi* dan hal ini terjadi sampai tahap akhir pengamatan (jam ke-12). Akan tetapi, jumlah sel *S. typhi* pada perlakuan tersebut masih dibawah kontrol. Peningkatan jumlah sel *S. typhi* terjadi dimungkinkan kecepatan replikasi virus lebih lambat daripada replikasi *S. typhi*, sehingga jumlah sel meningkat cukup signifikan. Bakteriofage akan menjadi lebih efektif dalam waktu yang singkat



setelah diisolasi atau digunakan pada perlakuan awal karena siklus bakteriofage litik biasanya kurang dari 30 menit dan bakteriofage dalam jumlah tertentu belum cukup untuk melisis semua *Salmonella* berkaitan dengan beberapa *Salmonella* dapat menjadi resisten terhadap bakteriofage, selain dikarenakan kemungkinan jumlah bakteriofage yang kurang sehingga jumlah koloni *Salmonella* meningkat (Filho et al., 2007).

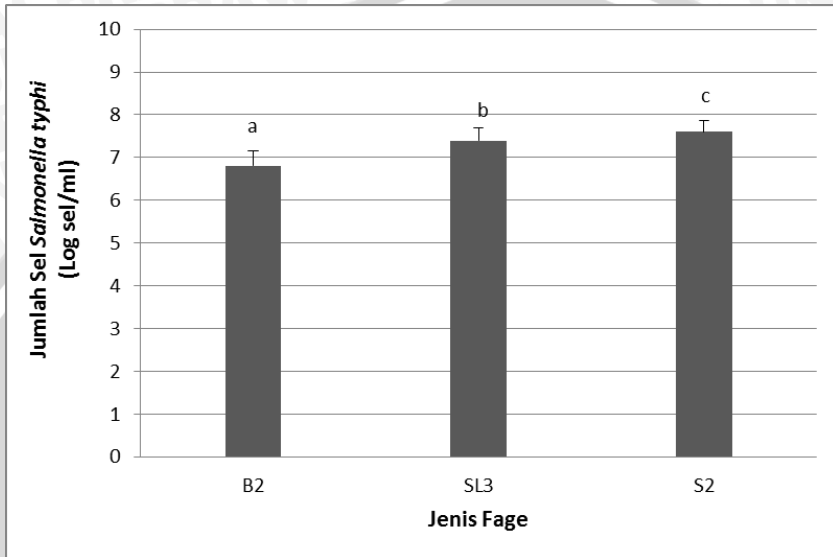
Berdasarkan densitas fage, isolat S2-St memiliki densitas tertinggi ( $1,20 \times 10^{10}$  PFU/ml) dibandingkan dengan kedua isolat bakteriofage lainnya B2-St ( $3,20 \times 10^8$  PFU/ml) dan SL3St ( $3,20 \times 10^9$  PFU/ml). Seharusnya dengan densitas tinggi diharapkan dapat menginfeksi sel *S. typhi* lebih banyak, namun dari hasil penelitian, isolat bakteriofage B2-St merupakan fage terbaik dengan menurunkan jumlah sel *S. typhi* terendah dengan densitas lebih kecil dibandingkan dengan S2-St dan SL3-St. Hal ini dimungkinkan jenis virus yang menginfeksi berbeda. Densitas virus belum tentu menentukan jumlah bakteri yang diinfeksi dan lisis, karena jenis virus yang berbeda memiliki kemampuan menginfeksi, bereplikasi dan melisis bakteri yang berbeda pula (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 dan Martinko, 2006).

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 *multiple 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

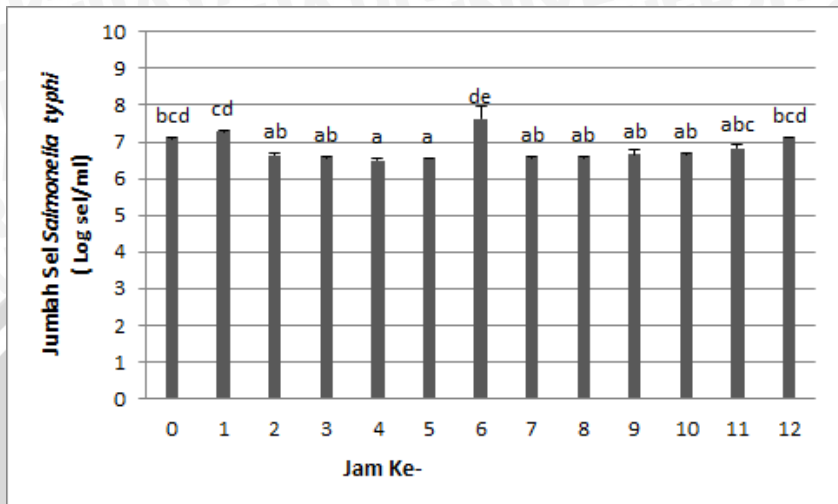


antara inang sel prokariotik dan virus yang menginfeksi (Madigan dan Martinko, 2006).



Gambar 4.5 Pengaruh jenis fage terhadap jumlah sel *S. typhi*. Notasi a, b, dan c menunjukkan beda nyata pengaruh antarjenis fage ( $p < 0,05$ )

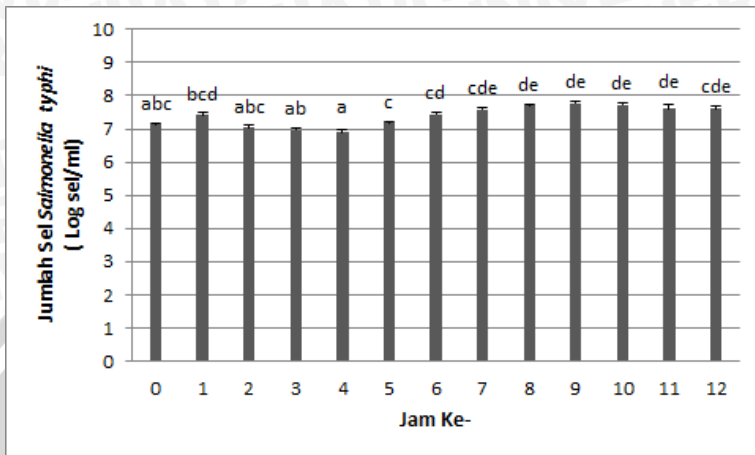
Jenis fage memengaruhi jumlah sel *S. typhi* secara signifikan ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 12). Kemampuan isolat bakteriofage B2-St dalam melisis sel *S. typhi* tampak lebih tinggi ( $\log 6,81 \pm 0,35$  sel/ml) daripada isolat bakteriofage SL3 ( $\log 7,39 \pm 0,31$  sel/ml) dan S2 ( $\log 7,60 \pm 0,27$  sel/ml), secara berurutan. Hal ini dapat disimpulkan bahwa isolat bakteriofage B2-St merupakan fage terbaik dalam menghambat pertumbuhan *S. typhi* dibandingkan dengan kedua isolat bakteriofage lainnya.



Gambar 4.6 Pengaruh isolat bakteriofage B2-St tiap jam terhadap jumlah sel *S. typhi*

Notasi a, b, c, d, dan e menunjukkan beda nyata pengaruh waktu aktivitas fage terhadap jumlah sel ( $p < 0,05$ )

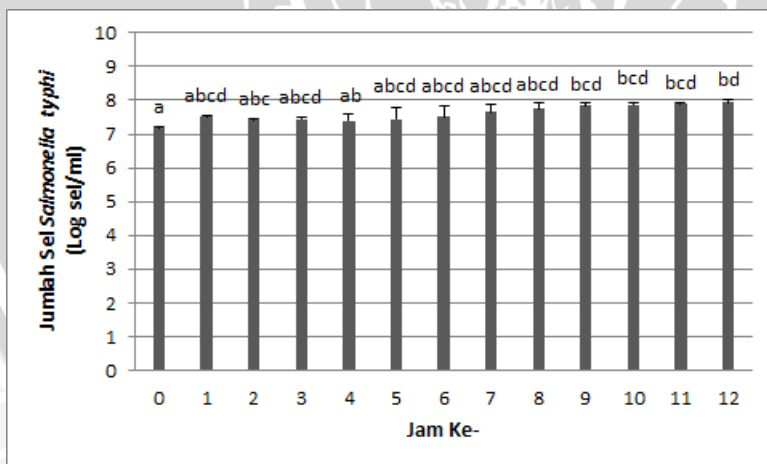
Berdasarkan uji Brown-Forsythe dengan uji lanjutan Games-Howell, diketahui bahwa isolat bakteriofage B2-St mampu menurunkan jumlah sel *S. typhi* sampai mencapai nilai terendah pada jam ke-4 dan ke-5,  $\log 6.50 \pm 0.03$  sel/ml dan  $\log 6.53 \pm 0.02$  sel/ml, secara berurutan (Gambar 4.6). Dengan demikian, lama waktu yang dibutuhkan untuk memberikan efek penghambatan yang terbaik adalah pada jam ke-4.



Gambar 4.7 Pengaruh isolat bakteriofage SL3-St tiap jam terhadap jumlah sel *Salmonella typhi*

Notasi a, b, c, d, dan e menunjukkan beda nyata pengaruh waktu aktivitas fage terhadap jumlah sel ( $p < 0,05$ )

Hasil yang hampir sama ditunjukkan oleh aktivitas isolat bakteriofage SL3-St. Aktivitas penghambatan optimum terhadap pertumbuhan *S. typhi* terjadi pada jam ke-4 (Gambar 14).



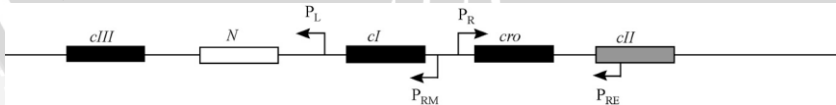
Gambar 4.8 Pengaruh isolat bakteriofage S2-St tiap jam terhadap jumlah sel *Salmonella typhi*

Notasi a, b, c, dan d menunjukkan beda nyata pengaruh waktu aktivitas fage terhadap jumlah sel ( $p < 0,05$ )

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

Peningkatan jumlah sel inang diduga juga disebabkan beralihnya siklus hidup virus menuju fase lisogenik. Proses infeksi virus diawali dengan mengenali protein reseptor spesifik dalam dinding sel suatu bakteri dan dilanjutkan menginjeksikan DNA virus ke dalam sel. Kemudian apakah siklus suatu virus masuk dalam fase litik atau lisogenik akan 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 bersaing 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 (Gambar 4.9) (Kutter dan 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 dan Martinko, 2006).



Gambar 4.9 Daerah regulator pada genom virus (Kutter dan Sulakvelidze, 2005)

Ada beberapa faktor yang harus dipenuhi supaya prosen 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 dan Martinko, 2006). 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 dan 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 dan Martinko, 2006).

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 mustrad. 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 dan Martinko, 2006).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan :

1. 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 *S. typhimurium* yang menandakan isolat bakteriofage yang didapatkan tidak spesifik pada *S. typhi*.
2. Pemberian bakteriofage pada kultur *S. typhi* memengaruhi aktivitas pertumbuhan sel *S. 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 *S. typhi* terendah ( $\log 6,81 \pm 0,35$  sel/ml).

### 5.2 Saran

Saran yang dapat direkomendasikan untuk penelitian lebih lanjut antara lain:

1. Perlu dilakukan uji *host range* pada beberapa bakteri patogen lain dan bakteri yang bersifat probiotik untuk mengetahui jenis inang pada bakteriofage yang diujikan.
2. Perlu dilakukan identifikasi secara molekuler dan pengamatan morfologi menggunakan mikroskop elektron untuk menentukan takson fage.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ackermann, H.W. 2006. 5500 Phages examined in the electron microscope (Brief Review). Archives of Virology Journal. 152: 227–243. doi 10.1007/s00705-006-0849-1
- Adisasmito, A.W. 2006. Penggunaan Antibiotik pada Terapi Demam Tifoid Anak di RSAB Harapan Kita. Sari Pediatri. 8( 3): 174-180.
- Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. 2004. The Life Cycle Of Bacteriophage Lambda. Garland Publishing: Taylor FrancisGroup.[http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/bact\\_Lambda.php](http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/bact_Lambda.php). Tanggal akses 18 Oktober 2011.
- Andriani, D. dan W. Kurniawati. 2007. Pengaruh Asam Asetat dan Asam Laktat sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Salmonella sp. yang diidolasi dari Karkas Ayam. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor.
- Bell, C and A. Kyriakides. 2002. *Salmonella* : A Practical Approach to The Organism and Its Control in Foods. Blackwell Science. London.
- Beswandjarum. 2011. Mekanisme Patogen *Salmonella*. [http://www.beswandjarum.com/article\\_download\\_pdf/article\\_pdf\\_24.pdf](http://www.beswandjarum.com/article_download_pdf/article_pdf_24.pdf). Tanggal akses : 14 Juni 2011.
- Bielke, L., S. Higgins, A. Donoghue, D. Donoghue, and B.M. Hargis. 2007. *Salmonella* Host Range of Bacteriophages That Infect Multiple Genera. Journal of Polutry Science. 86:2536–2540 .doi:10.3382/ps.2007-00250
- Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A.N. Trostel, B. Powell, R. Carlton. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin–resistant *Enterococcus faecium*. Journal of Infect Immun. 70:204–210.
- Büchen-Osmond, C. 2000. Taxonomy and Classification of Viruses. . <http://ictvdb.bio-mirror.cn/MCM8.pdf>. Tanggal akses 3 Desember 2011.
- Clover, D. 1990. Foodborne Disease. Food Research Institute, Department of Bacteriology and WHO collaborating on Food Virology and WHO. University of Wisconsin. Madison. Wisconsin. USA.
- Clokie, M.R.J and A.M. Kropinski. 2009. **Bacteriophages: Methods and Protocols**. Humana Press. UK.

- Cui, S. 2004. Detection and Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in Food. Thesis. University of Maryland. UK.
- Fardiaz, Srikandi. 1996. Strategi Riset bidang Mikrobiologi Untuk meningkatkan Keamanan Pangan di Indonesia. <http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/43934/Riwayat-hidup.pdf>. Tanggal akses : 14 Juni 2011.
- Filho, R.L.A., J.P. Higgins S.E., G. Ganoa, A.D Wolfenden, G. Tellez and M. Hargis. 2007. Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis In Vitro and In Vivo. *Poultry Science*. 86:1904-1909.
- Ebi. 2011. Picture of Bacteriophage. [http://www.ebi.ac.uk/microarray/biology\\_intro\\_files/virus.htm](http://www.ebi.ac.uk/microarray/biology_intro_files/virus.htm). Tanggal Akses 18 Oktober 2011
- García, P., B. Martí'nez, J.M. Obeso and A. Rodríguez. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Journal of Applied Microbiology*. 47: 479–485. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x
- Grabow, W.O.K. 2001. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA Journal*. 27:251-268
- Hagens, S. and M.L. Offerhaus. 2008. Bacteriophage-A New Weapons for Food Safety. *Journal of Food Technology*. 4(8):46-54.
- Hariyadi, Purwiyatno. 2008. Isu Terkini Terkait Dengan Keamanan Pangan.[http://seafast.ipb.ac.id/article/isu\\_terkini\\_keamanan\\_pangan.pdf](http://seafast.ipb.ac.id/article/isu_terkini_keamanan_pangan.pdf). Tanggal akses : 14 Juni 2011.
- Huff, W. E., G.R. Huff, N.C. Rath, J.M. Balog, and A.M. Donoghue. 2005. Alternatives to Antibiotics: Utilization of Bacteriophage to Treat Colibacillosis and Prevent Foodborne Pathogens. *Poultry Science Journal*. 84:655–659
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). 1996. *Microorganisms in Food. 2. Sampling for Microbiological Analysis Principles and Specific Applications*. 2nd Edition. Chapman and Hall, Glasgow.
- Islam, K.K., M.M. Sagor, Raihan Ali, S.M. Abdul-awal, P.P. Adhikary, P.K. Sarker, and A.S. Rakib. 2005. Bacteriophage : A Potential therapeutic agent (A Review). *Biotechnology and genetic Engineering Discipline Life Science School khulna University Khulna-9208. Bangladesh. Journal of Medical Science*. 5(1):1-9.



- Kanjana. 2007. Isolation and partial characterization of Salmonella typhi-specific bacteriophage. *KKU Science Journal*. 35(3) 162-169
- Kompas. 2010. Selada : Lindungi Paru, Cegah Kanker. <http://kesehatan.kompas.com/read/2010/04/23/0915024/Selada..> Lindungi.Paru..Cegah.Kanker. Tanggal akses : 17 Maret 2011.
- Kocharunchitt, C., T. Ross, and D.L. McNeil. 2008. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control Salmonella associated with seed sprouts. *International Journal of Food Microbiology*. 128:453–459. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.014
- Kramer, D.E. and L. Brown. 2007. International Smoked Seafood Conference Proceedings. Anchorage, Alaska, USA.
- Kutter, E. and A. Sulakvelidze. 2005. **Bacteriophages : Biology and Applications**. CRC Press. Florida. United States
- Leverentz, B., W.S Conway, M.J Camp, W.J. Janisiewicz, T. Abuladze, Yang, M., R. Saftner. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4519–4526. doi: 10.1128/AEM.69.8.4519–4526.2003
- Madigan, M.T. and J.M. Martinko. 2006. **Brock Biology of Microorganisms (Eleventh edition)**. Pearson Education, Inc. USA
- Marriot, N.G. 1999. **Principle of Food Sanitation.4th Edition**. Aspen Publ. Inc., Gather-sburg, Maryland.
- Microbiologybytes. 2011. Virus Taxonomy. <http://www.microbiologybytes.com/virology/VirusGroups.html>. Tanggal akses 3 Desember 2011
- O’Flynn, G., R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and A. Coffey. 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 Titer)**. Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies. USA
- Smith, G.V.C., C. Billington, A.J. Cornelius, J.A. Hudson and J.A. Heinemann. 2006. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *Journal of Federation of*



- European Microbiological Societies (FEMS). 217:1-6.  
doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00217.x
- Snyder, L. and W. Champness. 2003. **Lytic Bacteriophages : Genetic Analysis and Tranduction In: Molecular Genetic of Bacteria.** ASM Press. Washington DC. USA.
- Sonderholm, J. 2008. Use of Antibiotic in Food Animals.  
[http://www.keepantibioticsworking.com/new/indepth\\_keyevid.cfm](http://www.keepantibioticsworking.com/new/indepth_keyevid.cfm). Tanggal akses : 6 Oktober 2011.
- Stephenson, F.H. 2003. **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (A Guide to Mathematics in The Laboratory).** Academic Press. United States
- Strauch, E., J.A. Hammerl and S. Hertwig. 2007. Bacteriophages: New Tools for Safer Food. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin. Germany
- Todar, Kenneth. 2011. *Salmonella* and Salmonellosis.<http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html>. Tanggal akses : 10 Mei 2011.
- Waluyo. 2005. Bioremediasi Limbah Domestik Ramah Lingkungan: Uji Antagonistik Isolat Actinomycetes dan Fungi dari Limbah *Septic Tank*, Comberan, dan Bekas Air Mandi Terhadap Bakteri Patogen. Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah, Malang.
- Winarti, C. dan 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.* Elsevier Science Ltd. UK.
- Zein, U., S.K. Huda, dan J. Ginting. 2004. Diare Akut Disebabkan Bakteri. Fakultas Kedokteran. Divisi Penyakit Tropik dan Infeksi. Bagian Ilmu Penyakit Dalam. Universitas Sumatera Utara.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Pembuatan media

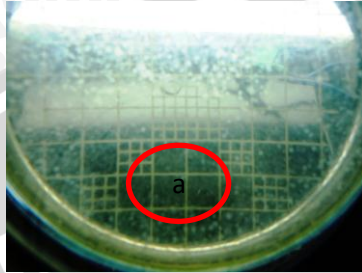
- a. Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) 100 ml
  - TSB 3 gr
  - Bacto Agar 1,5 gr
  - Akuades 100 ml
- b. Media TSB (*Tryptic Soy Broth*) 100 ml
  - TSB 3 gr
  - Akuades 100 ml
- c. Media TSA Semisolid 0,6% 100 ml
  - TSB 3 gr
  - Bacto Agar 0,6 gr
  - Akuades 100 ml
- d. Buffer SM 100 ml
  - Tris HCl 1M pH 7,4 - 7,5
  - MgSO<sub>4</sub> 1M
  - NaCl 1M
  - Gelatin 2%
  - Akuades sampai volume 100 ml

### Lampiran 2. Isolasi bakteriofage

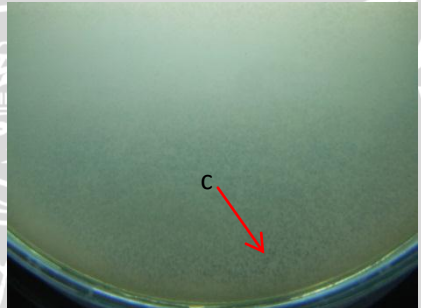
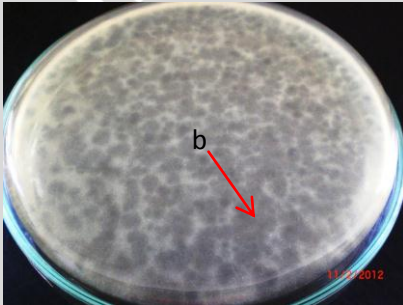
No.	Sumber	Kode Isolat	Host	Keterangan
1	Brantas	B2-St	<i>Salmonella typhi</i>	(+)
		B2-Stm	<i>Salmonella typhimurium</i>	(+)
		B3-St	<i>Salmonella typhi</i>	(+)
		B3-Stm	<i>Salmonella typhimurium</i>	(+)
2	Septic Tank	S1-St	<i>Salmonella typhi</i>	(+)
		S1-Stm	<i>Salmonella typhimurium</i>	(+)
		S2-St	<i>Salmonella typhi</i>	(+)
		S2-Stm	<i>Salmonella typhimurium</i>	(-)
3	Air Selokan	SL1-St	<i>Salmonella typhi</i>	(+)
		SL1-Stm	<i>Salmonella typhimurium</i>	(-)
		SL3-St	<i>Salmonella typhi</i>	(+)
		SL3-Stm	<i>Salmonella typhimurium</i>	(-)

Ket : (+) : ada plaque  
 (-) : tidak ada plaque

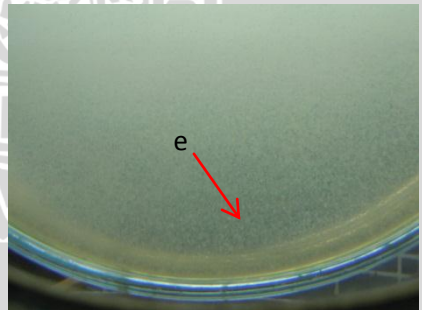
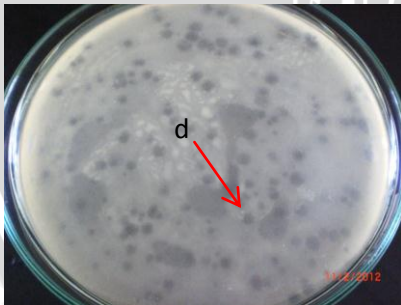
**Lampiran 3. Overlay isolat bakteriofage terhadap *Salmonella typhi***



- a. Pembentukan plaque oleh isolat bakteriofage B2-St

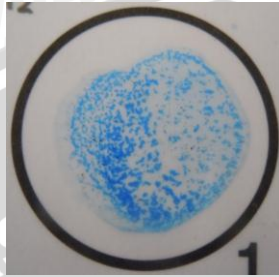


- b. Pembentukan plaque oleh isolat bakteriofage S1-St
- c. Pembentukan plaque oleh isolat bakteriofage S2-St

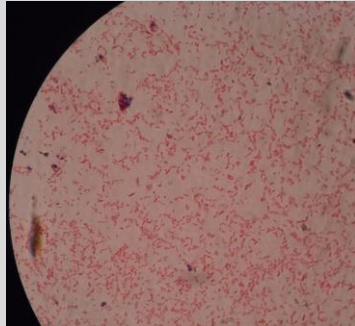


- d. Pembentukan plaque oleh isolat bakteriofage SL1-St
- e. Pembentukan plaque oleh isolat bakteriofage SL3-St

**Lampiran 4.** Uji latex terhadap isolat *Salmonella typhi*

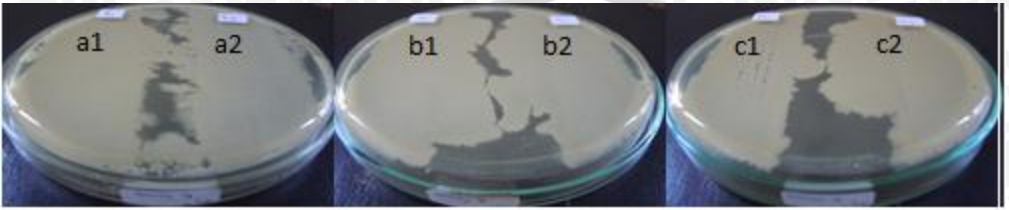


**Lampiran 5.** Morfologi sel isolat *Salmonella typhi*



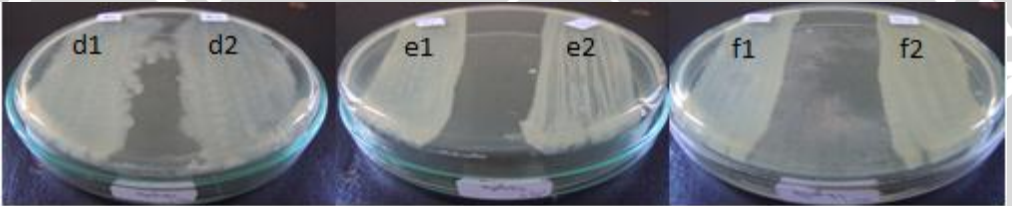


**Lampiran 6.** Uji *host range* pada bakteri *Bacillus cereus*



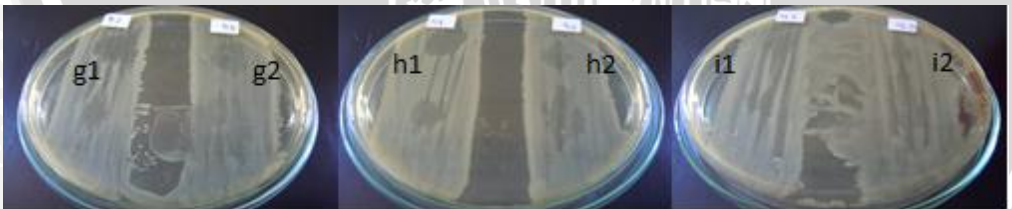
- a1. isolat bakteriofage B2-St; a2 isolat bakteriofage B3-St
- b1. isolat bakteriofage S1-St; b2 isolat bakteriofage S2-St
- c1. Isolate bakteriofage SL1-St; c2 isolat bakteriofage SL3-St

**Lampiran 7.** Uji *host range* pada bakteri *Shigella disenteriae*



- d1. isolat bakteriofage B2-St; d2 isolat bakteriofage B3-St
- e1. isolat bakteriofage S1-St; e2 isolat bakteriofage S2-St
- f1. Isolate bakteriofage SL1-St; f2 isolat bakteriofage SL3-St

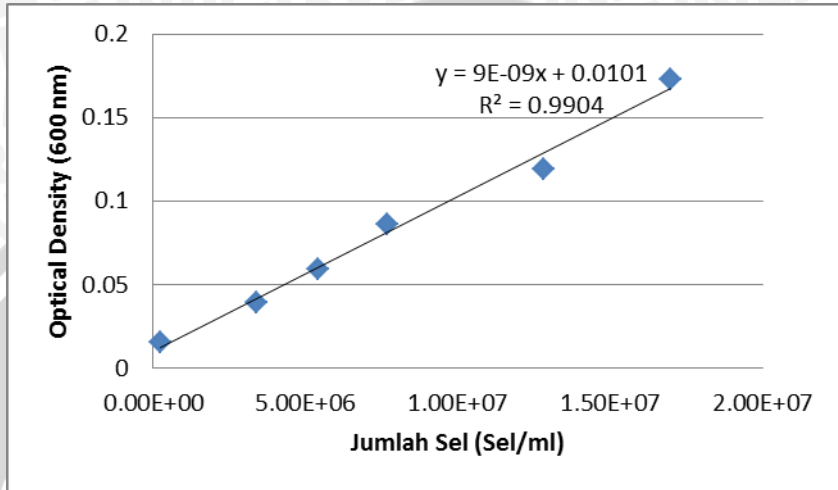
**Lampiran 8.** Uji *host range* pada bakteri *Salmonella typhimurium*



- g1. isolat bakteriofage B2-St; g2 isolat bakteriofage B3-St
- h1. isolat bakteriofage S1-St; h2 isolat bakteriofage S2-St
- i1. Isolate bakteriofage SL1-St; i2 isolat bakteriofage SL3-St



**Lampiran 9.** Persamaan kurva standar bakteri *Salmonella typhi*



**Lampiran 10.** Perhitungan jumlah inokulum isolat bakteriofage yang dimasukkan dalam uji aktivitas bakteriofage terhadap *Salmonella typhi*

Perhitungan menggunakan rumus menurut Stephenson (2003) sebagai berikut :

Misalnya : Berapa volume bakteriofage yang ditambahkan jika dalam stok bakteriofage (S2-St) memiliki densitas  $1.2 \times 10^{10}$  PFU/ml dengan jumlah sel *Salmonella*  $5 \times 10^6$  sel/ml sehingga diperoleh MOI 50?

Maka

$$x = \text{MOI} / \text{Jumlah Sel } Salmonella = 50 / 5 \times 10^6 = 2.5 \times 10^8 \text{ fage}$$

$$y = x / \text{densitas stok bakteriofage (S2St)} = 2.5 \times 10^8 / 1.2 \times 10^{10} = 0.02 \text{ ml}$$

$$\text{Volume bakteriofage} = 0.02 \text{ ml} \times 10 = 0.2 \text{ ml}$$

Volume stok bakteriofage yang ditambahkan dalam uji aktivitas bakteriofage untuk diperoleh MOI 50 dengan jumlah sel *Salmonella*  $5 \times 10^6$  sel/ml :

$$\text{B2-St} = 0.7 \text{ ml}, \text{ S2-St} = 0.2 \text{ ml}, \text{ SL3-St} = 0.7 \text{ ml}$$

Sedangkan jumlah sel *Salmonella typhi* yang diperlukan dalam uji aktivitas bakteriofage adalah  $10^6$  sel/ml dan dihitung dengan menggunakan rumus menurut Stephenson (2003) sebagai berikut :

- Per. Kurva Standar yang didapat adalah  $Y = 9.10 X + 0.010$
- Hasil absorbansi inokulum *Salmonella typhi* inkubasi 1 jam adalah 0.566 dan dikonversi dalam jumlah sel :

$$Y = 9.10 X + 0.010$$

$$0.566 = 9.10 X + 0.010$$

$$X = 6.10 \text{ sel/ml} \text{ ----- } X = M1$$

- Berapa ml inokulum *Salmonella typhi* yang dibutuhkan untuk mendapatkan jumlah sel *Salmonella typhi*  $5.10^6$  sel/ml dalam 150 ml TSB ?

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$6.10 . V1 = 5.10 . 150$$

$$V1 = 12.2 \text{ ml}$$

**Lampiran 11.** Uji normalitas terhadap Jumlah Sel *S. Typhi* selama uji aktivitas bakteriofage (B2-St,SL3-St,S2-St)  
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LOG10
N		117
Normal Parameters(a,b)	Mean	7.2700
	Std. Deviation	.45545
Most Extreme Differences	Absolute	.099
	Positive	.099
	Negative	-.090
Kolmogorov-Smirnov Z		1.071
Asymp. Sig. (2-tailed)		.202

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

**Lampiran 12.** Uji One Way Anova antar isolat bakteriofage B2-St, SL3-St, dan S2-St

**Descriptives**

LOG10

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
B2	39	6.8138	.34949	.05596	6.7006	6.9271	6.48	8.00
SL3	39	7.3928	.30802	.04932	7.2930	7.4927	6.82	7.81
S2	39	7.6033	.27042	.04330	7.5157	7.6910	7.17	8.00
Total	117	7.2700	.45545	.04211	7.1866	7.3534	6.48	8.00

**Test of Homogeneity of Variances**

LOG10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.793	2	114	.455

**ANOVA**

LOG10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.037	2	6.518	67.397	.000
Within Groups	11.026	114	.097		
Total	24.062	116			

LOG10

	Fage	N	Subset for alpha = .05			
			1	2	3	1
Tukey HSD(a)	B2	39	6.8138			
	SL3	39		7.3928		
	S2	39			7.6033	
	Sig.		1.000	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 39.000.

### Lampiran 13. Uji One Way Anova tiap isolat bakteriofage B2-St

#### Test of Homogeneity of Variances

LOG10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.889	12	26	.000

#### ANOVA

LOG10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.373	12	.364	35.245	.000
Within Groups	.269	26	.010		
Total	4.641	38			

#### Robust Tests of Equality of Means

LOG10

	Statistic(a)	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	35.245	12	3.163	.005

a Asymptotically F distributed.

LOG10

	B2	N	Subset for alpha = .05					
			1	2	3	4	5	1
Tukey	4	3	6.5000					
HSD(a)	5	3	6.5267					
	7	3	6.5533	6.5533				
	3	3	6.5633	6.5633				
	8	3	6.5733	6.5733				
	2	3	6.6333	6.6333				
	9	3	6.6667	6.6667				
	10	3	6.6667	6.6667				
	11	3		6.8333	6.8333			
	0	3			7.0767	7.0767		
	12	3			7.0967	7.0967		
	1	3				7.2633		
	6	3						7.6267
Sig.			.720	.088	.132	.569		1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## Lampiran 14. Uji One Way Anova tiap isolat bakteriofage SL3-St

### Test of Homogeneity of Variances

LOG10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.701	12	26	.125

### ANOVA

LOG10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.480	12	.290	60.127	.000
Within Groups	.125	26	.005		
Total	3.605	38			

### Robust Tests of Equality of Means

LOG10

	Statistic(a)	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	60.127	12	12.500	.000

a. Asymptotically F distributed.

LOG10

SL3		N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5	1
Tukey	4	3	6.8967				
HSD(a)	3	3	6.9700	6.9700			
	2	3	7.0433	7.0433	7.0433		
	0	3		7.1233	7.1233		
	5	3			7.1800		
	1	3				7.4233	
	6	3				7.4500	
	7	3				7.5933	7.5933
	12	3				7.6033	7.6033
	11	3				7.6133	7.6133
	8	3					7.7000
	10	3					7.7333
	9	3					7.7767
	Sig.		.365	.305	.467	.092	.117

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



## Lampiran 15. Uji One Way Anova tiap isolat bakteriofage S2-St

### Test of Homogeneity of Variances

LOG10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.709	12	26	.000

### ANOVA

LOG10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.031	12	.169	5.884	.000
Within Groups	.748	26	.029		
Total	2.779	38			

### Robust Tests of Equality of Means

LOG10

	Statistic(a)	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	5.884	12	9.629	.005

a. Asymptotically F distributed.

LOG10

	S2	N	Subset for alpha = .05				
			1	2	3	4	1
Tukey	0	3	7.1833				
HSD(a)	4	3	7.3833	7.3833			
	2	3	7.4267	7.4267	7.4267		
	5	3	7.4400	7.4400	7.4400	7.4400	
	3	3	7.4433	7.4433	7.4433	7.4433	
	1	3	7.5000	7.5000	7.5000	7.5000	
	6	3	7.5167	7.5167	7.5167	7.5167	
	7	3	7.6467	7.6467	7.6467	7.6467	
	8	3		7.7567	7.7567	7.7567	
	9	3		7.8500	7.8500	7.8500	
	10	3		7.8667	7.8667	7.8667	
	11	3			7.8967	7.8967	
	12	3				7.9333	
	Sig.		.093	.068	.084	.058	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.