

FAGE LITIK SPESIFIK *Escherichia coli* PADA LIMBAH CAIR PASAR TRADISIONAL DI KOTA BANDA ACEH

Iswadi

Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Syiah Kuala, Darussalam 23111, Banda Aceh
Email: iswadi_yusuf@unsyiah.ac.id

ABSTRAK

Perubahan kondisi lingkungan dan perilaku pasien dalam mengonsumsi antibiotik menyebabkan beberapa bakteri patogen menjadi resisten. Peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotik mendorong aplikasi fage sebagai biokontrol untuk mereduksi bakteri patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi fage litik pada limbah cair pasar tradisional yang mampu melisis bakteri *Escherichia coli*. Metode plak assay digunakan dalam mendeteksi fage litik pada limbah cair. Hasil assay fage dari sampel limbah cair pasar tradisional di Kota Banda Aceh memperlihatkan tidak terdeteksi adanya fage litik spesifik *E.coli*, hal ini diperlihatkan oleh tidak adanya pembentukan zona bening pada media *double layer* (plak assay negatif).

Kata Kunci: Fage litik, *Escherichia coli*, Limbah Cair

ABSTRACT

Changes in environmental conditions and behavior in patients taking antibiotics causes some pathogenic bacteria become resistant. Increased bacterial resistance to antibiotics encourages applications as biocontrol phage to reduce pathogenic bacteria. This research aims to detect lytic phage on liquid waste traditional market in lysizing *Escherichia coli* bacteria. Plaque assay method was used in detecting lytic phage in wastewater. The Phage assay results from samples of wastewater traditional markets in Banda Aceh showed that specific lytic phage of *E. coli* was not detected; it is shown by the absence of clear zone formation on double-layer media (plaque assay negative).

Keywords: Lytic Phage, *Escherichia coli*, Wastewater

PENDAHULUAN

Diare menjadi penyakit gastroenteritis akut dan persisten yang menjadi salah satu penyebab paling umum morbiditas dan mortalitas di Indonesia, meskipun banyak laporan menyebutkan bahwa Indonesia telah mencapai kemajuan pesat dalam pemberantasan diare. Prevalensi diare tertinggi di Indonesia pada tahun 2007 adalah Provinsi Aceh dengan angka tertinggi 18,9% [1]. *Escherichia coli* merupakan salah satu penyebab diare yang merupakan permasalahan kesehatan bagi masyarakat di Indonesia meskipun pada umumnya baru terindikasi pada kejadian luar biasa [2].

Hasil pengujian polaresistensi terhadap beberapa jenis antibiotik secara *in vitro*

menunjukkan bahwa *Escherichia coli* mengalami resistensi terhadap antibiotik jenis β -laktam, aminoglikosida, golongan kuinolon, dan beberapa jenis antibiotik yang umum digunakan lainnya [3]. Kemudian Suardana, dkk. (2014) menyimpulkan bahwa hampir semua isolat *Escherichia coli* yang diisolasi dari feses ayam memperlihatkan sifat resistensi terhadap metisilin dan penisilin G dan sebagian lainnya menunjukkan sifat resistensi terhadap sulfa metoxazole-trimetoprim, doksisisiklin hidroklorida dan streptomisin [4].

Perubahan kondisi lingkungan dan perilaku pasien dalam mengonsumsi antibiotik menyebabkan beberapa bakteri patogen menjadi resisten. Peningkatan resistensi bakteri terhadap

antibiotik mendorong aplikasi fage sebagai biokontrol untuk mereduksi bakteri patogen. Fage litik adalah suatu metode alami dan non toksik untuk mereduksi dan mengontrol pertumbuhan bakteri patogen manusia, karena fage adalah bagian dari gastrointestinal dan ekosistem lingkungan.

Fage dapat diisolasi dari limbah, tinja, tanah, air, jaringan tubuh yang terserang penyakit atau produk dari pabrik susu. Sumber fage yang paling baik dan paling umum digunakan untuk mereduksi bakteri patogen adalah fage yang berasal dari habitat inangnya. Berdasarkan laporan Ongunseitani *et al* (1992), fage umum ditemukan di lingkungan terutama

pada sampel limbah cair, yaitu sebesar $3,16 \times 10^6$ fage dalam 1 mL air. Limbah merupakan habitat bakteri fekal (*coliform*) dan diduga di dalam limbah mengandung banyak galur fage bakteri koliform yang beragam. Beberapa fage telah diaplikasikan sebagai biokontrol pencemaran air dan makanan, namun belum banyak dilakukan di Indonesia [5].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi fage litik pada limbah cair pasar tradisional yang mampu melisis bakteri *Escherichia coli*, dan diharapkan dapat diaplikasikan sebagai biokontrol pencemaran air dan makanan sehingga dapat mencegah penyakit diare tanpa menggunakan terapi antibiotik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh. Sampel limbah cair diperoleh dari Pasar Lamnyong Baru, Pasar Peunayong dan Pasar Kampong Baro Kota Banda Aceh. Penelitian ini memiliki beberapa tahapan utama yaitu:

Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala Banda Aceh. Peremajaan dilakukan secara berkala pada media NA. Sebanyak satu lup bakteri *Escherichia coli* digoreskan pada media agar miring NA secara aseptik, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, disimpan pada suhu ruang dan diremajakan setiap dua bulan.

Isolasi Fage

Pengambilan dan Filtrasi Sampel
Sampel untuk isolasi fage dikumpulkan dari limbah cair Pasar Lamnyong Baru Gampong Rukoh Kecamatan Syiah Kuala Banda Aceh, Pasar Peunayong dan Pasar Kampong Baro Kota Banda Aceh yang disentrifugasi pada kecepatan 1052 x g selama 25 menit dan diulang dua kali. *Escherichia coli* digunakan sebagai detektor keberadaan fage spesifik. Sebanyak 5 mL dari sel pada fase logaritmik dari bakteri yang dibiakkan di dalam *Nutrient Broth* (NB), 10 mL

sampel air dan 50 mLNB dicampurkan. Campuran tersebut diinkubasi di dalam inkubator yang diatur pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah masa inkubasi berakhir, suspensi dijernihkan dengan sentrifugasi 1052 x g selama 25 menit dan dua ulangan. Selanjutnya disaring menggunakan membran selulosa dengan ukuran pori 0,22 µm. Suspensi yang diperkirakan mengandung fage disimpan pada suhu 4 °C.

Asai Fage. Uji plak dua lapis agar (Adams 1959) dilaksanakan sebagai berikut. Sebanyak 100 µL suspensi fage ditambahkan ke dalam 100 µL kultur *Escherichia coli* yang telah diinkubasi satu malam pada NB dan dicampur dengan 7 mL agar lembut (NB yang mengandung 0,7 % agar). Campuran agar lembut tersebut dituang ke atas lempengan *Nutrient Agar*(NA) dan kemudian diinkubasi satu malam pada suhu 37°C dan diamati pembentukan plak.

Pemurnian Fage. Pemurnian fage dilakukan dengan mengadopsi metode Goodridge *et al* (2003). Plak tunggal dengan ciri-ciri tersendiri yang berasal dari plak assay dipindahkan dengan menggunakan pipet Pasteur ke dalam tabung, kemudian dicampurkan dengan 2–3 mL pelarut Ringers konsentrasi 25%. Suspensi fage dihomogenkan dan dibiarkan selama 5–10 menit pada suhu ruang. Suspensi tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1052 x g, suhu 4°C selama 25 menit dan diulang dua kali. Supernatan difiltrasi

menggunakan dengan filter berpori 0,22 μm , untuk selanjutnya disimpan sebagai stok fage.

Preparasi Persediaan Fage. Sebanyak 10 μL kultur *Escherichia coli* (10^8CFU mL^{-1}) umur satu malam dan 100 μL fage (10^8PFU mL^{-1}) dicampur dengan 50 mLNB dan diinkubasi di dalam inkubator pengocok yang diatur pada kecepatan 120 rpm, suhu 37 °C selama 9jam. Suspensi diinkubasi dengan tambahan waktu 10 menit dan dikocok pada suhu 37 °C. Suspensi kemudian disentrifugasi pada 1052 x g selama 25 menit dan diulang dua kali. Supernatannya disaring dengan saringan berpori 0,22 μm . Suspensi fage disimpan pada suhu 4 °C [6].

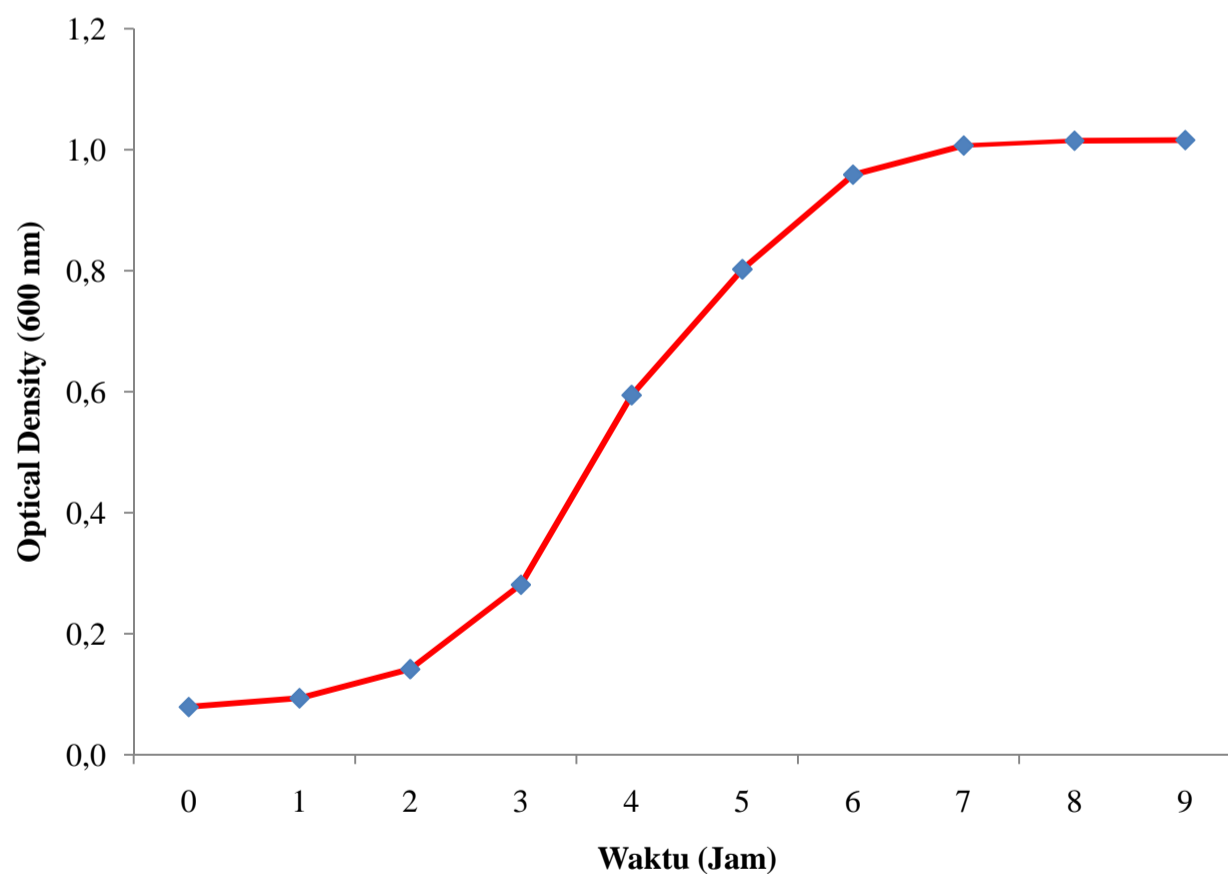
Kuantifikasi Fage. Kuantifikasi fage diukur dengan cara menghitung jumlah plak yang terbentuk (PFU mL^{-1}), penentuannya dilakukan berdasarkan metode Foschino *et al.* (1995). Stok fage diencerkan sampai dengan 10^{10} , kemudian dari masing-masing pengenceran tersebut diambil 100 μL ditambahkan dengan 100 μL kultur bakteri *E. coli* yang telah diinkubasi selama 9 jam pada media NB. Suspensi diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C. Sebanyak 7 mL *soft agar* bersuhu 42 °C dicampurkan, selanjutnya dituang ke media NA, diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam, diamati pembentukan plak dan dihitung jumlahnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan fase logaritmik dari bakteri inang dilakukan dengan melakukan penentuan kurva pertumbuhan. Metode turbidimetri (pengukuran jumlah sel bakteri berdasarkan kekeruhan) digunakan untuk analisis jumlah sel

bakteri inang, dimana *Optical Density* (OD) berbanding lurus dengan jumlah sel [7].

Metode turbidimetri memiliki kelebihan, yaitu cepat, tidak destruktif, dan tidak mahal. Kurva pertumbuhan bakteri inang *Escherichia coli* ditampilkan pada Gambar 1.



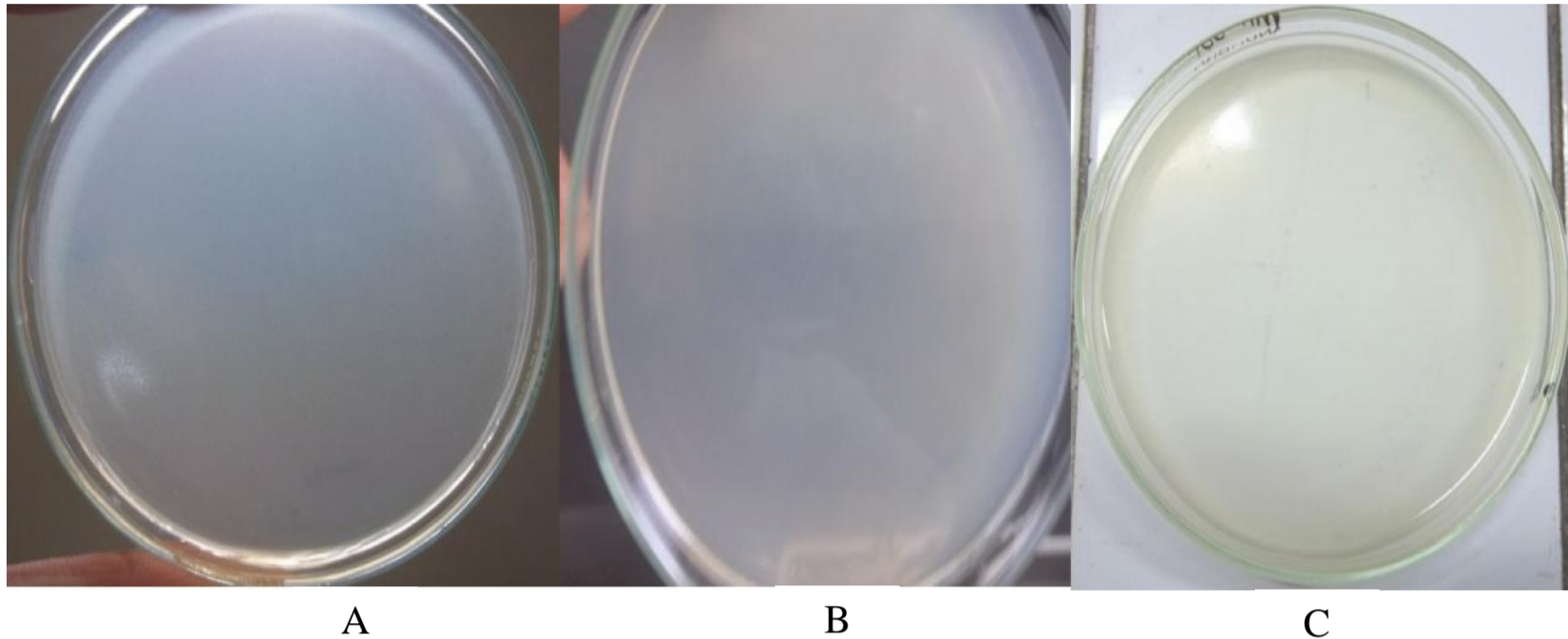
Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri *E. coli*

Sampel untuk isolasi fage dikumpulkan dari limbah cair Pasar Lamnyong Baru Gampong Rukoh Kecamatan Syiah Kuala, PasarPeunayongdanPasar Kampong Baro Kota Banda Aceh. Hasil asai fage dari sampel limbah

cair pasar-pasar tradisional tersebut memperlihatkan tidak terdeteksi adanya fage litik spesifik *Escherichia coli*, hal ini diperlihatkan oleh tidak adanya pembentukan zona bening pada media *double layer* (plak

assay negatif) (Gambar 2). Salah satu indikator bahwa di dalam cairan limbah yang digunakan sebagai sampel tidak ditemukan mengandung bakteri *Escherichia coli* yang merupakan inang bagi fage yang dideteksi adalah tidak

ditemukannya zona pada saat *plak assay*. Namun demikian, pernyataan ini belum dapat diterima sepenuhnya, mengingat pada saat kegiatan penelitian dilaksanakan sedang berlangsung musim hujan dengan intensitas tinggi.



Gambar 2. A, B, dan C Menunjukkan Hasil *Plak Assay* Negatif

Kemudian, fage merupakan virus yang menginfeksi bakteri dan hanya akan bereplikasi ketika menginfeksi inangnya. Pertumbuhan inang sangat mempengaruhi pembentukan plak, apabila pertumbuhan inang tidak merata akan mempengaruhi kemampuan infeksi fage dari satu sel ke sel lainnya. Pembentukan plak tidak

dapat berlangsung jika hanya beberapa sel terdekat saja dapat diinfeksi. Penggunaan media pendukung pertumbuhan bakteri yang lambat dapat menyebabkan penurunan ukuran ledakan sel yang terinfeksi dan memungkinkan plak yang terbentuk juga akan berukuran sangat kecil sehingga tidak terdeteksi.

KESIMPULAN

Fagelitik yang mampu melisis bakteri *Escherichia coli* tidak terdeteksi pada limbah cair pasar tradisional. Tidak terdeteksinya fage

tersebut dapat dipengaruhi oleh musim hujan dengan intensitas tinggi atau plak yang terbentuk berukuran sangat kecil.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. 2011. Situasi Diare di Indonesia. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*, 2(2): 1-18.
- [2] Hannif, Mulyani NS., dan Kuschithawati S. 2011. Faktor Resiko Diare Akut pada Balita. *Berita Kedokteran Masyarakat*, 27(1): 10-17.
- [3] Noviana H. 2004. Pola Kepekaan Antibiotika *Escherichia coli* yang Di isolasi dari Berbagai Spesimen Klinis. *Jurnal Kedokteran Trisakti*, 23(4): 122-126.
- [4] Suardana IW, Utama IH, Putiningsih PAS, dan Rudiyanto MD. 2014. Uji Kepekaan Antibiotika Isolat *Escherichia coli* O157:H7 Asal Feses Ayam. *Buletin Veteriner Udayana*, 6(1): 19-27.
- [5] Ongunseitan OA, Sayler GS, Miller RV. 1992. Application of DNA probes to analysis of bacteriophage distribution

- patterns in the environment. *Appl Environ Microbiol* 58:2046-2052.
- [6] Goodridge L, Gallaccio A, Griffiths WM. 2003. Morphological, host range, and genetic characterization of two colifages. *Appl Environ Microbiol* 69: 5364-5371.
- [7] Setya RA dan Putra SR. 2010. Identifikasi Biohidrogen secara Fermentatif dengan Kultur Campuran Menggunakan Glukosa sebagai Substrat. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Sepuluh November.
- [8] Volk AW dan Wheeler MF. 1988. *Mikrobiologi Dasar, Jilid I*. Jakarta: Penerbit Erlangga.