

ISOLASI BAKTERIOFAG *Salmonella* spp. dari BIOFILM pada SISTEM AIR MINUM ISI ULANG

Rahayu Damayanti, Siti Nur Jannah, Wijanarka, Sri Hartin Rahaju

Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi FSM Universitas Diponegoro. Jl.
Prof. Soedharto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275.
Email: radamayanti26@yahoo.com

Abstrak

Kebutuhan masyarakat terhadap air minum isi ulang meningkat sehingga mendorong berkembangnya Industri air minum isi ulang. Namun permasalahan yang terjadi adalah tidak adanya cara baku untuk mengolah air minum secara steril dan minimnya pengawasan dari pemerintah. Hal ini menimbulkan masalah sanitasi yaitu terbentuknya bakteri pathogen yang membentuk biofilm pada sistem air minum isi ulang. Salah satu bakteri pathogen adalah *Salmonella*. *Salmonella* pada air minum isi ulang dapat menimbulkan diare, karena dapat menghasilkan racun cytotoxin dan enterotoxin. Bakteriofag merupakan virus yang menginfeksi bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan isolat bakteriofag alami dari sampel biofilm untuk menginfeksi bakteri *Salmonella* spp. pada sistem air minum isi ulang. Isolat *Salmonella* spp. positif berada pada pengenceran kedua depot air minum isi ulang. Isolasi bakteriofag dari biofilm dilakukan dengan amplifikasi bakteriofag dan filtrat bakteriofag. Uji infeksi dilakukan menggunakan *Salmonella enterica*, *Salmonella* 7A₁ dari Teluk Ambon dan *Salmonella* spp. dari depot air minum isi ulang. *Plating* dilakukan pada serial pengenceran fag ke-2 sampai pengenceran fag ke-10. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya plak yaitu pada sampel sumber air, produk air dan depot air minum. Jumlah plak yang terbentuk dihitung *Plaque Forming Units* (PFU/mL) untuk menentukan kuantifikasi atau perhitungan fag.

Kata kunci: Sistem air minum isi ulang, biofilm, *Salmonella* spp, bakteriofag.

Abstract

The public demands for the refill drinking water increases causing the development of refill drinking water industries. However, the problems occurred is no standard method to process drinking water with sterile and lack of government oversight. These cases give rise to sanitation which is the formation of bacteria pathogen forming biofilms in refill drinking water system. One of the bacteria pathogens is *Salmonella*. *Salmonella* in refill drinking water can cause diarrhea, because it can produce cytotoxin and enterotoxin. Bacteriophages are viruses that infect bacteria. This study aims to find natural isolates of bacteriophage from biofilm samples to infect *Salmonella* spp. in refill drinking water system. The isolates obtained is then characterized by biochemical test including Gram stain, a test Kligler Iron Agar (KIA) and api assay 20 E. The positive *Salmonella* spp. isolates are in the second dilution refill drinking water depot. The isolation of bacteriophage from

biofilm is conducted with bacteriophages amplification and bacteriophage filtrate. The Infection test is performed by using *Salmonella enterica*, *Salmonella* 7A₁ from Teluk Ambon and *Salmonella* spp. from refill drinking water depot. Plating is performed on serial dilutions of 10⁻² to 10⁻¹⁰ phage dilution. Positive result is characterized by the formation of plaque which is in source water samples, water product and drinking water depot. The number of plaques formed is calculated by Plaque Forming Units (PFU/mL) to determine quantification or calculation phages.

Keyword: refill drinking water systems, biofilms, *salmonella* spp, bacteriophage

PENDAHULUAN

Air minum isi ulang telah menjadi pilihan umum masyarakat Indonesia karena harga yang cenderung lebih murah dan mudah diperoleh. Hal ini mendorong berkembangnya Industri Depot Air Minum (DAM) isi ulang yang siap melayani masyarakat. Setiap depot air minum isi ulang memiliki instalasi untuk proses pembersihan wadah yang digunakan untuk menampung air minum isi ulang. Namun, permasalahan yang terjadi yaitu tidak terdapatnya cara baku agar pembersihan wadah yang lebih efektif. Di samping itu, sejumlah DAM kurang memenuhi standar ditinjau dari kesterilan alat-alat yang digunakan, higienitas pengolahan air serta jaringan pada pipa distribusi yang dapat menimbulkan terbentuknya koloni bakteri patogen. Mengacu pada standar *World Health Organization* (WHO), Kementerian Kesehatan RI telah menetapkan kriteria kualitas air secara mikrobiologis, melalui Peraturan Menteri Kesehatan No. 492/Menkes/Per/IV/2010, yaitu parameter mikrobiologi untuk *Escherichia coli* dan total bakteri koliform pada air minum kemasan yang diperbolehkan per 100 ml sampel adalah 0 (tidak boleh mengandung *Escherichia coli* dan koliform setiap 100 ml sampel).

Sistem distribusi air minum isi ulang yang ditemukan bakteri patogen sehingga memicu terbentuknya biofilm yang dipercepat proses sisa disinfektan dan konsentrasi rendah substrat yang ada dalam air minum. Biofilm merupakan salah satu masalah sanitasi yang umum dihadapi industri pangan sehingga upaya untuk mengurangi pembentukannya selalu dilakukan. Penelitian sebelumnya untuk mengurangi biofilm menggunakan *chemical sanitizer*. Penelitian ini dilakukan untuk menemukan bakteriofag alami di biofilm agar dapat menginfeksi bakteri *Salmonella* pada sistem air minum isi ulang. Menurut Dharmojo (2001) dalam Poeloengan dkk., (2014), bahaya adanya bakteri *Salmonella* pada air minum isi ulang dapat menimbulkan diare karena *Salmonella* menghasilkan racun cytotoxin dan enterotoxin. Bakteri dari genus *Salmonella* merupakan bakteri penyebab infeksi. Jika tertelan dan masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan gejala salmonellosis. Strategi yang dapat dilakukan dalam mengatasi permasalahan biofilm yaitu dengan menggabungkan agen antimikroba dengan zat yang mampu merusak lapisan permukaan pertumbuhan bakteri. Salah satu alternatif solusi

potensial adalah penggunaan virus bakteri/bakteriofag yang mampu melisis bakteri pembentuk biofilm.

Bakteriofag merupakan virus yang menginfeksi bakteri dan mampu membunuh sel bakteri dengan mengintegrasikan DNA virus ke kromosom bakteri inang. Penggunaan bakteriofag ternyata relatif lebih efisien, spesifik dan *cost effective* (Parisien *et al.* 2007 dalam Rahaju, 2014). Virus dapat diisolasi dengan membentuk zona bening (*plak*) pada lapisan sel inangnya. Plak juga dapat dibentuk oleh *phages* pada pertumbuhan bakteri. Hal ini diasumsikan bahwa plak merupakan hasil dari infeksi sel oleh virion tunggal (Carter and Saunders, 2007 dalam Rahaju, 2014). Belum adanya laporan mengenai “Isolasi Bakteriofag *Salmonella* spp. dari Biofilm pada Sistem Air Minum Isi Ulang”, sehingga perlu dilakukan penelitian ini lebih lanjut untuk menemukan kandidat spesifik bakteriofag *Salmonella* spp. dari biofilm.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium mikrobiologi kesehatan, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong.

Isolasi bakteri *Salmonella* spp.

Isolasi bakteri *Salmonella* spp. dari biofilm dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan cara pengenceran dan filtrasi. Isolasi *Salmonella* spp. dengan cara filtrasi dilakukan dengan cara 100 ml sampel air difiltrasi menggunakan membran filter steril 0,2 μm . Kemudian kertas membran diletakkan pada media SS agar. Sampel diinkubasikan ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C (Brown, 2001). Pertumbuhan bakteri *Salmonella* secara morfologi memiliki warna koloni bening dengan inti kehitaman. Kultur murni *Salmonella* spp. kemudian dilakukan pewarnaan gram dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk membuktikan bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif. Kultur murni *Salmonella* spp. ditanam di media *Kligler Iron Agar* (KIA), inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolat yang menunjukkan alkali/reaksi asam dengan atau tanpa gas dan produksi H₂S merupakan bakteri *Salmonella* spp. Bakteri *Salmonella* spp. diuji secara biokimia menggunakan kit Api 20 E. Pada 20 *tube* ditambahkan suspensi NaCl sebanyak 5 ml. Suspensi bakteri *Salmonella* spp. dimasukkan ke dalam *tube strip*. Uji CIT, VP dan GEL dimasukkan suspensi bakteri pada bagian *tube* dan *cupule*. Untuk uji lainnya, dimasukkan hanya bagian *tube* saja. Pada uji ADH, LDC, ODC, H₂S dan URE dibuat anaerob dengan menambahkan mineral oil pada bagian *cupule*. Tutup box inkubasi dan diinkubasi pada suhu 36°C selama 18-24 jam. Setelah inkubasi, baca strip sesuai dengan *reading table*. Jika 3 atau lebih uji positif, maka tambahkan reagen TDA pada uji TDA. Pada uji indol tambahkan reagen james dan pada uji VP ditambahkan reagen VP 1 dan VP 2. Hasil identifikasi bakteri menggunakan api 20 E dibaca

dengan software *apiweb*TM. Hasil yang diperoleh pada software *apiweb*TM menunjukkan 96,6% merupakan bakteri *Salmonella* spp. (Biomerieux, 2009).

Isolasi bakteriofag

Amplifikasi bakteriofag (Rahaju, 2014)

Amplifikasi bakteriofag dilakukan dengan mencampur 2 ml media cair LB 10x dimasukkan ke erlenmeyer, ditambahkan sampel biofilm sebanyak 3 ml, selanjutnya ditambahkan 5 ml kultur *Salmonella* spp. yang telah ditanam sebelumnya (*overnight culture*), diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Amplifikasi bakteriofag untuk sampel produk air dilakukan dengan mencampur 5 ml LB 10x dimasukkan ke erlenmeyer, ditambahkan sampel air 40 ml, selanjutnya ditambahkan 5 ml kultur *Salmonella* spp. yang telah ditanam sebelumnya (*overnight culture*), diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm.

Filtrat Bakteriofag I (Rahaju, 2014)

Filtrat bakteriofag I dengan memindahkan 10 ml kultur bakteriofag ke dalam tabung sentrifus lalu disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan disaring menggunakan membran filter 0,2 µm, diperoleh filtrat bakteriofag I.

Filtrat Bakteriofag II (Rahaju, 2014)

Pengkayaan FB I dilakukan dengan menambahkan 4 ml FB I pada 1 ml media cair LB konsentrasi 10x, kemudian inokulasikan 5 ml kultur inang diinkubasi pada suhu 37°C, *dishaker* dengan 100 rpm selama 24 jam. Filtrat yang didapatkan disimpan pada suhu 4°C.

Peremajaan inang (*Log Phase*) (Rahaju, 2014)

Peremajaan dilakukan dengan mengambil kultur inang 0,5% yang telah ditanam sebelumnya (*overnight culture*), diinokulasi ke 10 ml LB 1x, dilakukan inkubasi selama 1 jam, selanjutnya dilakukan pengukuran setiap jam pada OD600 *Optical Density*. OD diukur secara spektrofotometri, apabila 0,2 yang diperoleh dapat dipergunakan untuk *plating*.

Uji *plaque assay* (Rahaju, 2014)

Uji *plaque assay* dilakukan pada *ependorf* (1,5 ml) berisi 0,9 ml PBS ditambah 0,1 ml filtrat bakteriofag lalu dihomogenkan dengan *vortex*, serta dilakukan seri pengenceran satu sampai tabung ke sepuluh. Sebagai kontrol dilakukan dengan menambahkan 0,1 ml inang *Salmonella* spp. Masing-masing *ependorf* berisi 0,5 ml inang dengan OD 0,2 ditambah masing-masing 0,1 ml dari setiap seri pengenceran dua sampai ke sepuluh, kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam *water bath incubator* (suhu 37°C). *Plating* dilakukan dengan mencampurkan masing-masing tabung *ependorf* ke dalam LB agar semisolid, di *vortex*, dan dituangkan pada media LB agar *solid*. Diamkan selama 10 menit hingga memadat dan diinkubasi secara terbalik pada suhu 37°C hingga tumbuh demikian pula halnya untuk kontrol..

Perhitungan titer bakteriofag (Dulbecco, 1953 dalam Kusumawardani, 2015)

Plak yang terbentuk dalam petri dihitung dengan cara menghitung plak yang terbentuk pada cawan petri. *Plaque Forming Units* (PFU/mL) dilakukan untuk menentukan kuantifikasi atau perhitungan fage. Perhitungan rumus Pfu, sebagai berikut:

$$\text{Titer virus (Pfu/mL)} = \frac{\text{Jumlah Plak (Pfu)}}{\text{Pengenceran} \times \text{Volume inokulum (mL)}}$$

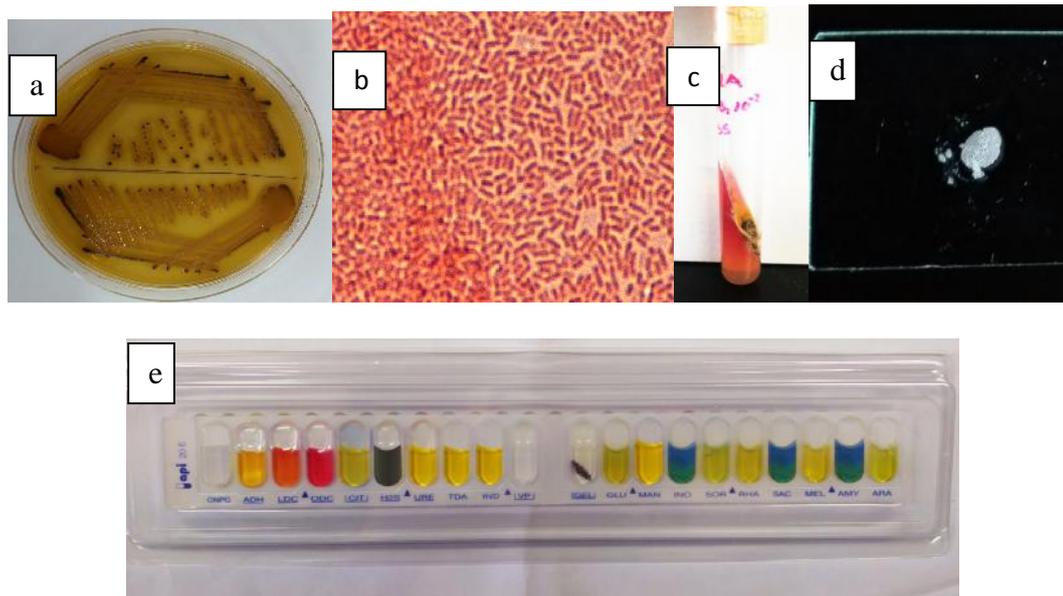
Penyimpanan bakteriofag (Rahaju, 2014)

Bakteriofag disimpan dengan cara isolat *discrubbing*, dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang sebelumnya telah diisi larutan PBS sebanyak 1 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan dengan kloroform sebanyak 1 tetes per 1 ml PBS. Tabung disimpan pada suhu 4 °C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan bakteri *Salmonella* spp. pada media selektif

Indikasi bakteri *Salmonella* dilakukan dengan cara melihat morfologi bakteri pada media selektif *Salmonella-Shigella* Agar yaitu berwarna *colorless* dengan *black center* yang membuktikan bahwa koloni tersebut merupakan bakteri *Salmonella* spp. *Salmonella* menghasilkan hidrogen sulfida dari natrium tiosulfat dan karenanya tampak sebagai koloni merah dengan pusat hitam. Bakteri yang diduga sebagai *Salmonella* spp. ditandai dengan warna koloni hitam mengkilat yang selanjutnya digunakan sebagai biakan murni (Gambar 4.1). Selanjutnya, *Salmonella* spp. dilakukan pewarnaan Gram. Setelah dilakukan pewarnaan Gram ternyata *Salmonella* spp. termasuk bakteri Gram negatif dengan ciri menghasilkan batang warna merah muda pada pemeriksaan mikroskopis. Menurut Joklik *et al.* (1988) dalam Karsinah *et al.* (1994), *Salmonella* spp. merupakan bakteri gram negatif yang bersifat motil, dengan panjang 1,0 sampai 3,0 µm memiliki lebar 0,8 sampai 1,0 µm. Bentuk *Salmonella* spp. dengan perbesaran 1000x dapat dilihat pada Gambar 4.1. Bakteri *Salmonella* spp. pada media *Kligler Iron Agar* dapat memfermentasi dekstrosa dan tidak dapat memfermentasi laktosa, serta mampu memproduksi H₂S. Isolat bakteri *Salmonella* dari depot air minum pada uji katalase bersifat positif katalase, hal ini ditandai dengan terbentuknya gelembung gas dan menunjukkan bahwa isolat bakteri yang diperoleh mampu menghasilkan enzim katalase. Berdasarkan data *confirm by serological tests* api 20 E dapat disimpulkan bahwa 96,6% merupakan bakteri *Salmonella* spp. (Gambar 4.1.e). Isolat ini siap digunakan untuk isolat *inang* pada bakteriofag.



Gambar 4.1 Bakteri *Salmonella* spp. pada SS Agar (a) Mikroskopis bakteri *Salmonella* spp. perbesaran 1000x (b) *Salmonella* spp. pada media KIA (c) *Salmonella* spp pada uji katalase (d) hasil uji api 20 E *Salmonella* spp. (e)

Isolasi Bakteriofag *Salmonella* spp. dari Biofilm

Isolasi bakteriofag *Salmonella* spp. dari biofilm dilakukan untuk memperoleh bakteriofag *Salmonella* spp. di sumber air, produk air minum serta depot air minum isi ulang wilayah Cibinong, Jawa Barat. Amplifikasi bakteriofag dilakukan untuk mendapatkan bakteriofag yang spesifik bagi bakteri *Salmonella* spp. Hal ini dilakukan dengan mencampurkan sampel biofilm, medium LB 10x dan kultur *Salmonella* spp. yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur bakteriofag yang diperoleh kemudian disentrifuse. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifuse disaring menggunakan *syringe* tip steril berpori 0,2 µm. *Syringe* tip steril berpori 0,2 berfungsi untuk menyaring bakteriofag sehingga hanya bakteriofag saja yang bisa melewati filter tersebut. Menurut Brown 2001, Filter ini memiliki ukuran pori 0,2 mikron, yang memegang kembali semua bakteri, sehingga hanya virion bakteriofag yang melewatinya. Hasil dari penyaringan tersebut merupakan filtrat bakteriofag. Filtrat bakteriofag merupakan hasil filtrasi yang dilakukan setelah proses amplifikasi bakteriofag. Fungsi dari amplifikasi adalah memperbanyak jumlah bakteriofag. Semakin banyak bakteriofag yang didapatkan, semakin mudah memperoleh bakteriofag spesifik untuk *Salmonella*.

Uji plaque assay

Sebelum melakukan uji *plaque assay*, perlu dilakukan peremajaan inang *Salmonella* spp. Kultur inang ini telah diinokulasikan 3 jam sebelumnya hingga mencapai nilai *optical density* 0,2. Menurut (Atlas, 1995), Nilai *optical density* (OD) 0,2-0,5 merupakan kisaran bakteri dalam fase log. Pada fase logaritmik, sel

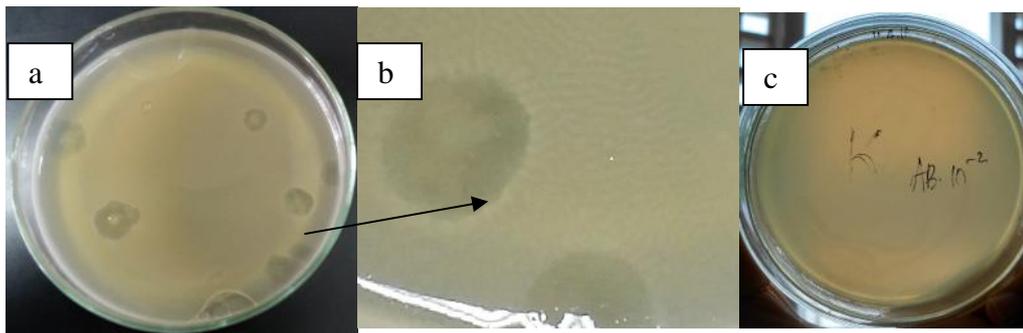
berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang. Selama fase ini, masa dan volume sel meningkat oleh faktor yang sama dalam arti rata-rata komposisi sel dan konsentrasi relatif metabolit tetap konstan (Brock & Madigan, 1991). Inang yang digunakan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Saat nilai OD *Salmonella* spp. sudah mencapai 0,2 maka inang ini siap digunakan untuk uji *plaque assay*. Uji *plaque assay* merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui unit infeksi virus. Pada saat virus memulai infeksi pada sel inang maka akan terbentuk zona bening yang disebut plak. Menurut (Kusnadi dkk., 2003 dalam Rahmawati, 2012), wilayah terang pada lapisan sel inang dinamakan plak yang diasumsikan bahwa setiap plak berasal dari satu partikel virus. Interpretasi positif adanya plak diperoleh dari inang *Salmonella* spp. pada pengenceran fag tertentu. Hal ini menandakan bahwa bakteri *Salmonella* spp. dapat diinfeksi oleh bakteriofag spesifik *Salmonella*. Hasil plak yang diperoleh dikarenakan bakteriofag dan inang *Salmonella* berada pada satu habitat maka besar kemungkinan memperoleh bakteriofag spesifik *Salmonella*. Sampel dengan bakteri inang *Salmonella* spp. yang teramati memiliki plak dapat dipastikan positif memiliki bakteriofag. Hasil isolasi bakteriofag menggunakan *Salmonella* spp. dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 4.1. Hasil Isolasi Bakteriofag menggunakan *Salmonella* spp. dari Beberapa Sampel

No	Sampel	Titer Bakteriofag
1.	DAM	$0,09 \times 10^6$
2.	DAM	$0,7 \times 10^7$
3.	Produk Air	$1,59 \times 10^7$
4.	Sumber Air	$1,26 \times 10^8$
5.	Sumber Air	$3,32 \times 10^9$
6.	Sumber Air	$1,01 \times 10^9$
7.	Sumber Air	$0,24 \times 10^8$
8.	Sumber Air	$1,3 \times 10^6$

Ket: * Plak positif bakteri *Salmonella* spp. pada sampel DAM

Jumlah plak yang terbentuk pada sampel DAM dengan pengenceran ke-5 yaitu 7 buah. Penampakkannya dapat dilihat pada Gambar 4.4 a.



Gambar 4.2 Penampakan plak positif *Salmonella* spp. (a) Hasil zoom plak positif *Salmonella* spp. (b) kontrol *Salmonella* spp. pada media Luria Bertani (c)

Semakin banyak jumlah plak yang teramati, maka semakin tinggi pula konsentrasi bakteriofag di dalam sampel. Menurut (Rahaju, 2014), Interpretasi positif yang ditandai dengan adanya bakteriofag yaitu terbentuknya zona bening (plak). Hal ini dikarenakan virus menginjeksikan material genetiknya (DNA atau RNA) untuk bereplikasi dan berkembang menjadi partikel virus dengan menggunakan 'mesin reproduksi' sel bakteri dan menyebar dengan melisis sel tersebut. Bakteriofag hanya dapat menginfeksi satu atau beberapa strain atau spesies bakteri, dan akan menyerap ke daerah tertentu dari selubung sel inang kemudian menembus sel inang dengan seluruh virion masuk ke sel genom. Bakteriofag kemudian akan melanjutkan siklus hidupnya. Setelah menembus sel, beberapa salinan bakteriofag dilepaskan. Bakteriofag menginfeksi sebagian besar isolat *Salmonella* dan relatif sedikit dari genera lain (Bennett *et al.* 1997 dalam Rahaju, 2014). Bakteriofag telah menginfeksi sel inang *Salmonella* maka sel yang tumbuh menjadi semakin terkikis sehingga akan tampak zona bening yang disebut plak. Menurut (Hagens and Loessner, 2007 dalam Farid *dkk.*, 2013) bakteriofag virus ini sangat spesifik terhadap spesies dan strain bakteri targetnya. Plak yang muncul membuktikan bahwa bakteri *Salmonella* spp. dapat diinfeksi oleh bakteriofag dari sumber air, produk air minum dan DAM wilayah Cibinong.

Plak yang terbentuk kemudian *discrubbing* menggunakan ose bulat dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Hasil supernatan kemudian diambil dan ditambahkan *chloroform* setiap 1 ml supernatan. *Chloroform* berguna untuk menghentikan aktivitas sel sementara pada isolat bakteriofag. Selanjutnya, hasil *scrubbing* tersebut disimpan pada suhu 4°C untuk mencegah kerusakan isolat bakteriofag akibat oksidasi dan kontaminasi.

SIMPULAN

Dari hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa pada sampel biofilm sistem air minum isi ulang di daerah cibinong, Jawa Barat terdapat bakteri *Salmonella* spp. Bakteri *Salmonella* tersebut diperoleh dari isolasi biofilm

sampel DAM pengenceran kedua. Isolat bakteriofag yang diperoleh dari hasil isolasi merupakan bakteriofag spesifik yang dapat menginfeksi *Salmonella* spp.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas RM. 1995. Principles of Microbiology. St. Louis: Mosby.
- Biomerieux. 2009. Identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods. France.
- Brooks GF *et al* (ed). 1991. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 19th ed, Appleton & Lange, Connecticut.
- Brown E. Alfred. 2001. Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology Eight Edition. Mc-Graw Hill Companies. California.
- Farid, M., Galih S., Nurul R.D., Norita F. A., Sela R. 2013. Pemanfaatan Bakteriofag untuk Pengembangan Kit Deteksi Bakteri Penyebab Hawar Bakteri pada Kedelai. *Jurnal Agroteknologi Pertanian Universitas Jember*: p. 1-7
- Joklik WK, Willet HP., Amos DB., Wilfert CM., 1988. Zinsser Microbiology. 19th Edition, Connecticut: Prentice-Hall International Inc.,
- Karsinah, Lucky HM, Suharto, Mardiasuti. 1994. Batang Gram Negatif. Jakarta. Binarupa Aksara, p. 168-73.
- Kusumawardani, D. 2015. Pengamatan Virus Pada Bakteri dengan Metode *Plaque*. *Laporan Praktikum Virologi*. Universitas Jendral Soedirman. Purwokerto
- Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 492/Menkes/Per/IV/. 2010. Tentang Persyaratan Kualitas Air Minum
- Poeloengan M., Iyep K., Susan M.N. 2014. Bahaya *Salmonella* Terhadap Kesehatan. *Jurnal Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*. Bogor
- Rahaju. S.H. 2014. Metoda Pengkayaan, Filtrasi, dan Pertumbuhan untuk Isolasi Bateriafag Spesifik *Salmonella typhimurium* pada Sampel Air. *Journal Sains, Teknologi, dan Kesehatan*. 4 (1): 315-322.
- Rahmawati, Y. 2012. Eksplorasi Bakteriofag Virulen Terhadap *Xanthomonas Campestris* Pv. *Campestris* Asal Tawangmangu dalam Pengendalian Penyakit Busuk Hitam Kubis. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

