

ISOLASI BAKTERIOFAG *Escherichia coli* DARI SISTEM DISTRIBUSI AIR MINUM ISI ULANG SEBAGAI ANTIBIOFILM

Dani Sukma Saefunida¹, Wijanarka¹, M.G Isworo Rukmi¹, Novik Nur Hidayat²

¹Jurusan Biologi, Universitas Diponegoro
²Lemabaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)

ABSTRAK

E. coli termasuk golongan bakteri koliform sebagai indikator kualitas air yang dapat membentuk biofilm pada sistem distribusi air minum isi ulang. Biofilm tersebut dapat menyebabkan kontaminasi dan penyebaran penyakit. Bakteriofag yang memiliki kemampuan dalam melisis inang dapat dijadikan solusi permasalahan tersebut. Tujuan penelitian adalah untuk mengisolasi bakteriofag *E. coli* dari sistem distribusi air minum isi ulang dan menguji aktivitas antibiofilm. Isolasi bakteriofag dilakukan dengan metode *plaque assay*, sedangkan uji aktivitas antibiofilm menggunakan metode *microtiter plate assay*. Sampel yang digunakan adalah biofilm dari pipa sumber air, tangki penyimpanan depot air minum dan produk air minum isi ulang. Hasil penelitian menunjukkan bakteriofag *E. coli* dapat diperoleh dari masing-masing sampel dan memiliki aktivitas antibiofilm.

Kata Kunci : *Antibiofilm, Bakteriofag, E. coli*.

PENDAHULUAN

Air merupakan sumber kehidupan bagi manusia yang dibutuhkan dalam aktivitas sehari-hari. Kepadatan populasi penduduk dan pembangunan secara berlebihan menyebabkan terjadinya pendangkalan sumur serta berkurangnya daerah resapan air. Hal ini menimbulkan krisis air bersih.

Depot Air Minum muncul sebagai salah satu solusi permasalahan air bersih. Air DAM lebih banyak diminati masyarakat karena lebih murah, praktis, dan mudah

didapat, namun sering pula ditemukan DAM yang tidak menjamin produk yang dihasilkan, terutama masalah kontaminasi. Kontaminasi disebabkan karena rendahnya higienitas pengolahan air, jaringan distribusi, dan kesetrlan alat-alat yang digunakan. Salah satu contoh kasus DAM yaitu dari hasil pembinaan dan inspeksi DAM di Depok, menemukan 212 depot air minum yang tidak memenuhi syarat dari total 331. Hal ini terjadi karena adanya endapan dan pencucian galon oleh mesin

pencuci yang tidak sempurna (Anonim, 2015).

Air minum yang terkontaminasi dapat disebabkan dari adanya kandungan koliform, termasuk *E. coli*. Bakteri koliform yang terdapat pada sistem distribusi air minum, termasuk sumber air baku dan pengolahan air, sebagian besar ditemukan dalam bentuk biofilm yang melekat pada permukaan pipa selang air. Hal ini berisiko terhadap penyebaran penyakit yang bersumber dari air seperti diare dan penyakit akibat parasit.

Sejauh ini solusi yang diterapkan untuk penghilangan biofilm adalah dengan menggunakan senyawa kimia seperti klorin, H₂O₂ dan surfaktan (Buana dan Wardani, 2014). Penggunaan senyawa kimia ini kurang efektif karena menimbulkan resistensi dan perubahan genetik bakteri yang dapat membahayakan bagi lingkungan, konsekuensi penyakit lebih tinggi dan biofilm semakin sulit untuk dihilangkan. Bakteriofag memiliki keunggulan karena mampu menginfeksi dan melisiskan bakteri spesifik dengan menghasilkan enzim lisozim. Hal tersebut menjadi salah satu keuntungan penggunaan bakteriofag sebagai biokontrol bakteri yang lebih aman. Oleh karena itu, dilakukan penelitian isolasi bakteriofag *Escherichia coli* dari sistem

distribusi air minum isi ulang dan menguji aktivitas antibiofilmnya.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan di tiga titik, yaitu *pertama*, tiga sumber air baku yang terdapat di wilayah Jalan Alternatif Sentul. Sampel biofilm diambil pada bagian pipa saluran air baku ke dalam mobil tangki distribusi air baku. *Kedua*, yaitu tiga Depot Air Minum Isi Ulang di kawasan Sempora, Cibinong. Sampel biofilm diambil pada bagian tangki air. Sampling biofilm dilakukan dengan cara mengusap biofilm dengan menggunakan *cotton swab* steril, dan dimasukkan ke dalam 5 mL LB cair kemudian divorteks hingga homogen (Mulamattathil *et al.*, 2014). *Ketiga*, yaitu tiga produk air minum hasil olahan air Depot Air Minum dengan mengambil produk air minum masing-masing sebanyak 1 L ke dalam botol steril.

Isolasi *E. coli*

Isolasi *E. coli* dilakukan dengan 2 macam metode, yaitu filtrasi dan *spread plate* (Brown, 2012). Filtrasi menggunakan *vaccum filtration* dengan kertas saring berukuran 0,20 µm. Metode kedua yaitu *spread plate*, dengan cara suspensi biofilm

diencerkan ke dalam PBS hingga pengenceran 10^{-3} . Isolasi *E. coli* menggunakan media EMB. Isolat yang menunjukkan koloni positif, diamati secara mikroskopis melalui pewarnaan Gram (Brown, 2012). Selanjutnya uji KIA dilakukan dengan cara menusukkan media KIA dengan satu ose koloni bakteri (Brown and Smith, 2015).

Isolasi bakteriofag

Johson dan Case (2010) tahapan *pertama*, yaitu amplifikasi bakteriofag dengan cara suspensi biofilm dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 40 mL ditambah 5 ml LB cair 10x dan 5 mL kultur *E. coli* umur 24 jam yang telah diremajakan pada media LB cair, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada *shaker* 100 rpm. Tahap *kedua* adalah filtrasi bakteriofag dengan mensentrifugasi kultur bakteriofag pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan difiltrasi dengan *syringe* menggunakan membran filter $0,20\ \mu\text{m}$ steril. Filtrat I diamplifikasi ulang dengan menambahkan 1 mL LB 10x dan 5 mL *E. coli* ke dalam 4 mL filtrat I. Campuran diinkubasi selama 24 jam dan dilakukan filtrasi II. Filtrat I dan filtrat II disimpan pada suhu 4°C .

Plaque assay

Kultur *E. coli* dibuat dengan memasukkan 1% *E. coli* 24 jam pada 50 mL LB cair dan diinkubasi pada shaker kecepatan 100 rpm, 24 jam. *Optical Density* (OD) *E. coli* diukur, kemudian sebanyak 0,5% kultur diinokulasikan pada 10 mL LB cair. *E. coli* diukur OD₆₀₀ per jam dengan spektrofotometri hingga didapatkan OD 0,2 yang merupakan awal *log phase*. Filtrat bakteriofag diencerkan hingga 10^{-8} . Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam 0,5 mL *E. coli* OD 0,2 kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam *waterbath* inkubator. Kontrol dibuat dengan menambahkan 0,5 mL *E. coli*. Masing-masing perlakuan ditambahkan 6 mL LB semi padat, kemudian dituangkan ke dalam media LB padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan berupa plak yang terbentuk pada cawan petri, dan dilakukan perhitungan titer bakteriofag (Brown, 2012).

Penyimpanan bakteriofag

Penyimpanan bakteriofag dengan mengambil plak yang telah terbentuk dengan menggunakan ose plastik dan dimasukkan ke dalam 1 mL PBS. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan

ditambahkan klorofom sebanyak 1 tetes per mL dan disimpan pada suhu 4°C.

Uji Antibiofilm

1). Uji Pelisisan Biofilm

Uji pelisisan biofilm dilakukan dengan menggunakan metode *Microtiter Plate Assay* (Bjarnsholt *et al.*, 2011). Sebanyak 200 µL *E. coli* dimasukkan ke dalam mikroplat, kemudian LB cair dimasukkan ke dalam beberapa *well* sebagai blanko. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 3 hari. Cairan didalam mikroplat dikeluarkan dan dibilas menggunakan air. Mikroplat diberi perlakuan pengenceran filtrat bakteriofag hingga pengenceran 10⁻⁸ sebanyak 200 µL ke dalam masing-masing *well*. Beberapa *well* blanko diisi dengan PBS, masing-masing *well* berisi 200 µL. Mikroplat yang telah diberi perlakuan diinkubasi selama 24 jam. Mikroplat diberi 200 µL larutan kristal violet 0,2% dan diinkubasi 15 menit. Etanol 96% dimasukkan ke dalam mikroplat sebanyak 200 µL dan diinkubasi selama 15 menit selanjutnya diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada OD_{595nm} (Bjarnsholt *et al.*, 2011).

2). Uji Penghambatan Biofilm

Penghambatan biofilm dilakukan dengan mencampurkan 100 µL LB cair, 50 µL *E. coli* dan 50 µL masing-masing

pengenceran filtrat bakteriofag 10⁻⁴ hingga 10⁻⁸ ke dalam *well* mikroplat. Pembuatan kontrol negatif dengan menambahkan 150 µL *E. coli* yang dicampur dengan 50 µL PBS dan blanko berisi 150 µL LB cair dan 50 µL PBS. Inkubasi dilakukan selama 72 jam. Isi di dalam mikroplat dikeluarkan dan dibilas menggunakan air. Mikroplat diberi 200 µL kristal violet 0,2 % dan diinkubasi 15 menit. Etanol 96% sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam mikroplat dan diinkubasi selama 15 menit, selanjutnya diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada OD_{595nm} (Bjarnsholt *et al.*, 2011).

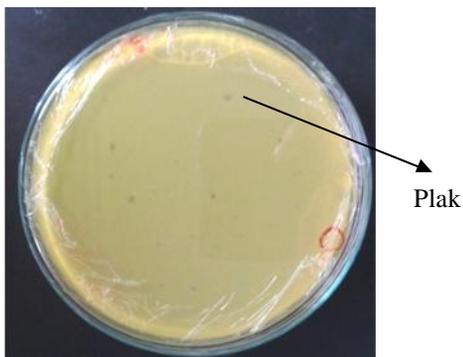
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi *E. coli* berdasarkan karakteristik koloni pada media EMB, morfologi mikroskopis dan reaksi KIA, diperoleh isolat 2C. Koloni pada media EMB berwarna merah hijau metalik, sel berbentuk batang dan termasuk Gram negatif. Hasil uji KIA menunjukkan produksi gas dan perubahan warna kuning akibat penurunan pH dari hasil dari fermentasi laktosa.

Isolat 2C merupakan hasil isolasi yang berasal dari produk air minum 2. *E. coli* yang ditemukan pada produk air minum isi ulang menunjukkan bahwa air tersebut

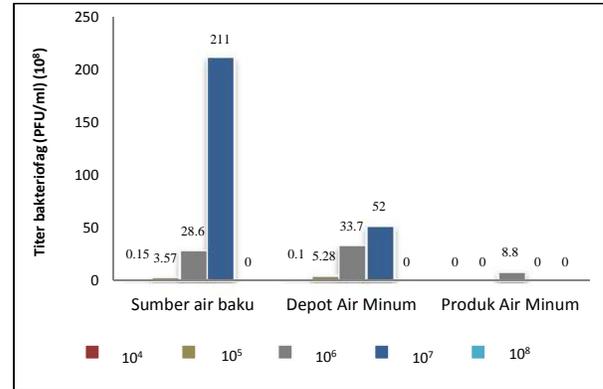
terdapat bakteri fekal dan beresiko terhadap mikroba patogen. Brown dan Smith (2015) menyatakan *E. coli* ditemukan sebagai mikrobiota normal pada saluran gastrointestinal manusia, namun tidak ditemukan pada air atau tanah. *E. coli* yang terdapat pada air mengindikasikan adanya kontaminasi fekal dan dapat menyebabkan penyakit yang berbahaya seperti diare, disentri dan lain sebagainya.

Hasil *plaque assay* menunjukkan adanya plak yang terbentuk pada masing-masing sampel. Plak terbentuk akibat dari bakteriofag yang mampu melisiskan sel *E. coli*. Bagian lapisan permukaan yang keruh tanpa adanya plak dikarenakan *E. coli* tumbuh dengan baik dan sel bakteri tidak terinfeksi oleh bakteriofag.



Gambar 1. Pembentukan plak pada *plaque assay*

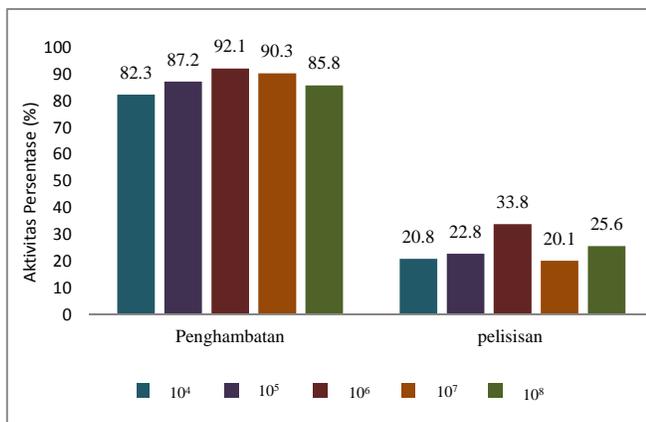
Jumlah titer bakteriofag yang menginfeksi sel bakteri dapat ditentukan melalui perhitungan *Plaque Forming Units* (PFU).



Gambar 2. Titer bakteriofag hasil *plaque assay* pada 3 jenis sampel

Data *plaque assay* menunjukkan jumlah titer bakteriofag pada pengenceran 10^4 merupakan titer bakteriofag terendah. Pengenceran 10^7 merupakan titer tertinggi, diikuti dengan ketidakhadiran plak pada pengenceran 10^8 . Variasi titer bakteriofag pada tiap pengenceran disebabkan karena adanya sistem pertahanan bakteri terhadap infeksi bakteriofag, sifat bakteriofag dan perlakuan pengenceran. Hal ini sesuai dengan pendapat Charles and Moineau (2009 dalam Buana dan Agustin, 2014) yaitu ketidakmampuan bakteriofag dalam melisiskan inangnya dapat terjadi karena adanya perbedaan kondisi lingkungan, pertumbuhan inang yang lebih cepat, sistem pertahanan terhadap infeksi bakteriofag secara alami. Jumlah plak juga dipengaruhi oleh spesifitas bakteri itu sendiri. Madigan *et al.* 2012 menyatakan virus yang tidak mampu menginfeksi bakteri dapat

disebabkan karena partikel bakteriofag yang dihasilkan selama infeksi memiliki beberapa bagian yang tidak sempurna. Bakteriofag *E. coli* yang terdapat pada sistem distribusi air minum isi ulang menunjukkan adanya kontaminasi fekal bakteri. Bakteriofag *E. coli* secara alami tidak akan bereplikasi tanpa adanya *E. coli*. Oleh karena itu bakteriofag *E. coli* dapat digunakan sebagai pendeteksi adanya air tercemar. Kehadiran *E. coli* akan langsung diinfeksi dan dilisiskan oleh bakteriofag. Hal ini sesuai dengan penelitian Espinosa *et al.* 2009 mengenai penggunaan bakteriofag *E. coli* sebagai indikator dalam mengevaluasi pengolahan air karena bakteriofag memiliki sifat toleran terhadap air.



Hasil aktivitas antibiofilm berupa

Gambar 3. Aktivitas antibiofilm oleh bakteriofag *E. coli* penghambatan dan pelisisan biofilm

menggunakan filtrat bakteriofag sumber air ditunjukkan pada Gambar 3.

Berdasarkan data tersebut aktivitas penghambatan biofilm tertinggi adalah 92.1% yang menunjukkan bakteriofag mampu menghancurkan inang *E. coli* terlebih dahulu sebelum membentuk biofilm. Bakteriofag mengeluarkan enzim lisozim saat melakukan penetrasi untuk membuat lubang pada dinding sel bakteri, sehingga DNA dapat masuk dan melisiskan *E. coli*. Bakteriofag yang keluar dari dalam tubuh inang, akan menginfeksi sel *E. coli* lain. Madigan *et al.* (2012) menyatakan peptidoglikan pada dinding sel bakteri mampu dihancurkan oleh enzim lisozim yang dihasilkan oleh bakteriofag. Enzim ini memecah ikatan -1,4-glycosidic dengan N-acetylglucosamine sehingga dapat menyebabkan dinding sel bakteri berlubang saat bakteriofag melakukan penetrasi dan melisiskan inang.

Uji pelisisan biofilm menunjukkan bakteriofag mampu melisiskan biofilm yang dibentuk oleh *E. coli*. Aktivitas presentase tertinggi adalah 33.8%. Harper *et al.* (2014) menyatakan mekanisme bakteriofag menyerang biofilm adalah bakteriofag masuk menembus EPS dan bereplikasi dalam sel inang mereka, sehingga mengakibatkan kenaikan jumlah

bakteriofag. Pelepasan ini menaikkan jumlah bakteriofag yang menginfeksi biofilm. Adanya penyebaran bakteriofag pada biofilm, menyebabkan produksi material EPS bakteri semakin berkurang. Bakteriofag dapat menghapus biofilm dan mengurangi potensi untuk beregenerasi. Uji pelisisan yang memiliki aktivitas presentase lebih rendah dibandingkan dengan uji penghambatan dapat disebabkan oleh kondisi *E. coli*. Carson *et al.* (2010) menyatakan faktor tersebut dapat terjadi karena produksi polisakarida depolimerase, kemampuan dalam menembusi EPS terhadap biofilm, jarak siklus litik dan jumlah bakteriofag yang dihasilkan saat keluar dari tubuh sel inang. Penelitian Carson *et al.* (2010) mengenai penggunaan bakteriofag coli-proteus dan T4 secara efektif mampu menghambat dan melisiskan biofilm *E. coli* dengan presentase 99.9%. Hal ini menunjukkan bahwa bakteriofag *E. coli* dapat dijadikan alternatif sebagai antibiofilm.

SIMPULAN

Bakteriofag *E. coli* yang ditemukan pada sistem distribusi air minum isi ulang, menunjukkan adanya kontaminasi bakteri fekal. Bakteriofag *E. coli* dapat dijadikan alternatif sebagai antibiofilm ditunjukkan

dengan kemampuannya dalam menghambat dan melisiskan biofilm.

SARAN

Penelitian ini dapat dianalisis lebih lanjut mengenai identifikasi bakteriofag *E. coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2015. Duh, Ratusan Depot Air Minum di Depok Tidak Layak!. Artikel. <http://metro.tempo.co/read/news/2015/10/09/083707880/duh-ratusan-depot-air-minum-di-depok-tidak-layak>. Diakses pada tanggal 30 Desember 2015.
- Bjarnsholt, T., C. Moser. P. Jensen, dan N. Hoiby. 2011. *Biofilm Infections*. Springer Science. New York.
- Brown, A.E. 2012. *Benson's Microbiological Applications : Laboratory Manual in General Microbiology*. Twelfth Edition. Mc Graw Hill. New York.
- Brown, A. E and H. Smith. 2015. *Benson's Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology*. Thirteenth Edition. Mc. Graw Hill. New York.
- Buana, E. dan A. K. Wardani. 2014. Isolasi Bakteriofag Litik Sebagai Agen Biosanitasi Pada Proses Pelisisan Bakteri Pembentuk Biofilm. *J. Pangan dan Agroindustri* 2 (2) : 36-42.
- Carson, L., S.P.Gorman dan B.F. Glimore. 2010. The Use of Lytic Bacteriophages in the Prevention and Eradication of Biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *J.*

- Fems Immunol Med Microbiol.* 59 : 447-455.
- Charles, F dan S. Moineau. 2009. Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetime. *Dalam* Buana, E. dan A. K. Wardani. 2014. Isolasi Bakteriofag Litik Sebagai Agen Biosanitasi Pada Proses Pelisisan Bakteri Pembentuk Biofilm. *J. Pangan dan Agroindustri* 2 (2) : 36-42
- Espinosa, A.C., C. Arias., S. Sanchez, dan M. Hiriart. 2009. Comparative Study of Enteric Viruses, Coliphages and Indicator Bacteria for Evaluating Water Quality in a Tropical High Altitude System. *J. Biomedcentral*.49 :1-10.
- Donlan, R.M. 2002. Biofilm : Microbial Life On Surfaces. *J. Emerging Infectious Disease.* 8 (9) : 881-890.
- Harper, D. R., H. M. R. T. Parracho., J. Walker., R. Sharp., G. Hughes., M. Wertlen., S. Lehman & S. Morales. 2014. Bacteriophages and Biofilm. *J. Antibiotics.* 3 (3) : 270-284.
- Johson, T. R and C. L. Case. 2010. *Laboratory Experiments in Microbiology. Ninth Edition.* Pearson Benjamin Cummings. USA.
- Madigan, M., J. Martinko., P. Dunlap, dan D. Clark. 2012. *Brock Biology of Microorganism. Thirteenth Edition.* Pearson Benjamin Cummings. United States America.
- Marshall, K.C. 1992. Biofilms : an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *Dalam* : Paraje, M. G. 2011. Antimicrobial Resistance In Biofilms. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Mendez-Vilas (Ed). 736-744.
- Menteri Perindustrian dan Perdagangan Republik Indonesia. 2004. Keputusan Menteri Perindustrian dan Perdagangan Republik Indonesia Nomor 651 tahun 2004 Tentang Persyaratan Teknis Depot Air MInum Dan Perdagangannya Menteri Perindustrian Dan Perdagangan Republik Indonesia. Jakarta.
- Mulamattathil, S. M., C. Bezuidenhout dan M. Mbewe. 2014. Biofilm Formation in Surface and Drinking Water Distribution System in Mafikeng, South Africa. *South African Journal of Science.*110. 1-9.
- Nester, E., D. G. Anderson., dan C. V. Roberts. 2012. *Microbiology. A Human Perspective. Seventh Edition.* Mc Graw Hill. New York.
- Rahaju, 2014. Metoda Pengkayaan, Filtrasi Dan Pertumbuhan Untuk Isolasi Bakteriofag Spesifik Salmonella Thyphimurium Sampel Air. *Seminar Nasional Penelitian dan PKM Sains Teknologi Kesehatan* : 315-322.
- Tortora, G.J., B. R. Funke & C. L . Case. 2010. *Microbiology : An Introduction. Tenth Edition.* Pearson. California.