

## ISOLASI BAKTERIOFAG SPESIFIK *Pseudomonas* sp. DA1 DARI BIOFILM PADA SISTEM PENGISIAN AIR MINUM ISI ULANG.

Zikra Hayati, Siti Nur Jannah, Agung Suprihadi  
Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika  
Universitas Diponegoro

### Abstrak

Kebutuhan masyarakat terhadap air minum isi ulang terus meningkat baik di perkotaan maupun di pedesaan. Keadaan tersebut mendorong berkembangnya Industri Depot Air Minum (DAM) isi ulang. Permasalahan yang timbul adalah tidak adanya cara baku untuk mengolah air minum secara steril dan minimnya pengawasan dari pemerintah. Hal ini menimbulkan masalah sanitasi yaitu dengan adanya bakteri patogen yang membentuk biofilm pada sistem air minum isi ulang. Salah satu bakteri patogen adalah *Pseudomonas*. Bahaya adanya bakteri *Pseudomonas* pada air minum isi ulang dapat menimbulkan infeksi pada saluran pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan isolat bakteriofag spesifik dari sampel biofilm untuk menginfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. pada sistem air minum isi ulang. Isolasi inang *Pseudomonas* dilakukan dengan 2 cara yaitu *pengenceran* dan *filtrasi* dan ditumbuhkan pada media selektif *Pseudomonas Isolation Agar*. Isolat yang diperoleh kemudian dikarakterisasi dengan pewarnaan gram dan uji *Kligler Iron Agar* (KIA). Isolasi bakteriofag dari biofilm dilakukan dengan cara *amplifikasi bakteriofag*, dan *filtrasi* untuk mendapatkan filtrat bakteriofag I dan filtrat bakteriofag II. Uji infeksi dilakukan dengan menggunakan inang *Pseudomonas* sp. DA1, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella* sp. (Koleksi LIPI). Hasil penelitian menunjukkan bahwa depot air minum isi ulang positif terdapat isolat *Pseudomonas* yaitu *Pseudomonas* sp. DA1 dan diperoleh isolat bakteriofag spesifik yang dapat menginfeksi *Pseudomonas* sp. DA1. Hasil perhitungan titer bakteriofag pada setiap sampel yaitu  $3,0 \times 10^5$  PFU/ml pada depot air minum,  $3,3 \times 10^7$  PFU/ml pada produk air, dan  $9 \times 10^7$  PFU/ml pada sumber air.

**Kata kunci:** *Sistem pengisian air minum isi ulang, biofilm, Pseudomonas sp DA1, bakteriofag.*

### Abstract

The social demand for drinking water increases both in urban and rural areas. The state encourages the development of Industrial Water Supply Depot (DAM) refills. problems occurred is no standard method for treating drinking water is sterile and lack of government supervision. This raises the issue of sanitation that is the presence of pathogenic bacteria that form biofilms in drinking water refill system. One of the bacterial pathogen is *Pseudomonas*. Bacteria *Pseudomonas* at refill drinking water can cause infections in the digestive tract. This study aims to find specific bacteriophage isolates of biofilm samples to infect bacteria *Pseudomonas* sp. on refill drinking water system. Isolation host *Pseudomonas* done in 2 ways dilution and filtration and grown on selective media *Pseudomonas Isolation Agar*. Isolates obtained were then characterized by gram staining and Kligler Iron Agar (KIA) test. Isolation of bacteriophages of biofilm done by bacteriophage amplification and filtration to obtain filtrate bacteriophage I and II. Test performed by using the host's infection *Pseudomonas* sp. DA1, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* sp. (LIPI's collection). The results showed that the drinking water refill depot contained positive isolates of *Pseudomonas* is *Pseudomonas* sp. DA1 and obtained isolate specific bakteriofag that can infect *Pseudomonas* sp. DA1. Bacteriophage titer calculation results on each sample at  $3,0 \times 10^5$  PFU/ml in drinking water depot,  $3,3 \times 10^7$  PFU/ml in the water product, and  $9 \times 10^7$  PFU/ml water sources.

**Keyword:** *refill drinking water systems, biofilms, Pseudomonas sp DA1, bacteriophage*

## PENDAHULUAN

Air Minum Isi Ulang (AMIU) telah menjadi pilihan umum masyarakat Indonesia. Kebutuhan masyarakat baik di pedesaan maupun di perkotaan terhadap air minum terus meningkat. Keadaan tersebut mendorong berkembangnya Industri Depot Air Minum (DAM). Kualitas air minum sangat mempengaruhi kesehatan masyarakat terutama yang mengkonsumsi air minum isi ulang. Setiap depot air minum isi ulang memiliki instalasi untuk proses pembersihan wadah. Wadah ini digunakan untuk menampung air minum isi ulang. Permasalahan yang terjadi yaitu tidak terdapatnya cara baku agar pembersihan wadah yang lebih efektif. Pembentukan biofilm dapat terjadi pada sistem distribusi air minum yang prosesnya dipercepat oleh adanya sisa disinfektan dan konsentrasi rendah substrat yang ada dalam air minum.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2002) adalah kriteria kualitas air secara mikrobiologis, melalui Keputusan Menteri Kesehatan No. 907 tahun 2002 bahwa air minum tidak diperbolehkan mengandung bakteri *coliform* dan *Escherichia coli*. Standar Nasional Indonesia (SNI) No. 01-3553-2006, air minum dalam kemasan selain tidak boleh mengandung bakteri patogen yaitu *Salmonella* dan *Pseudomonas* sp, juga tidak boleh mengandung cemaran mikroba lebih besar dari 100 koloni/ml.

Biofilm merupakan salah satu masalah pengawasan lingkungan yang umum dihadapi industri pangan sehingga selalu dilakukan cara untuk mengurangi pembentukan biofilm. Cara yang biasa digunakan adalah dengan menggunakan *chemical sanitizers*. Penggunaan *chemical sanitizers* dapat menyebabkan biofilm

tersebut resisten dan produk yang dihasilkan akan terkontaminasi. Cara alternatif yaitu dengan menggunakan agen biologis seperti bakteriofag. Bakteriofag memiliki potensi yang besar karena dalam penggunaannya tidak akan menimbulkan dampak negatif seperti pada *chemical sanitizers* (Buana, 2014).

Bakteriofag merupakan virus yang menginfeksi bakteri. Bakteriofag mampu membunuh sel bakteri secara langsung atau dengan menggabungkan DNA virus ke dalam kromosom bakteri inangnya (Budzik, 2003). Pemanfaatan kemampuan bakteriofag tersebut dapat digunakan untuk mengontrol biofilm dan mengurangi penggunaan *chemical sanitizer* (Nurizkiawan, 2011).

Belum banyak penelitian tentang penggunaan bakteriofag sebagai agen biokontrol *Pseudomonas* sp., sehingga perlu dilakukan penelitian ini untuk menemukan bakteriofag yang mampu menginfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. sebagai pembentuk biofilm pada sistem pengisian air minum isi ulang.

## METODE

### Isolasi bakteri *Pseudomonas* sp.

Isolasi bakteri *Pseudomonas* sp. dari biofilm dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan cara pengenceran dan filtrasi. Isolasi inang bakteri patogen *Pseudomonas* dilakukan dengan cara 0,9 ml PBS ditambahkan 0,1 ml sampel biofilm. Larutan divorteks supaya homogen dan dilakukan sesi pengenceran pertama sampai ketiga. Pengenceran kedua dan ketiga dituang ke dalam media PIA dan dilakukan *spread* pada media tersebut. Isolasi bakteri *Pseudomonas* dengan cara filtrasi dilakukan dengan cara 100 ml sampel air difiltrasi menggunakan

membran filter steril 0,22  $\mu\text{m}$ . Kertas membran diletakkan pada media PIA. Sampel diinkubasikan ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

### Isolasi Bakteriofag

Kultur isolat bakteri *Pseudomonas* sp. DA1 diremajakan pada 50 ml media LB cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur bakteri ini digunakan untuk proses amplifikasi bakteriofag.

Amplifikasi bakteriofag dilakukan dengan mencampur 2 ml media cair LB 10x dimasukkan ke erlenmeyer, ditambahkan sampel biofilm sebanyak 3 ml dan 5 ml kultur *Pseudomonas* sp. DA1 yang telah ditanam sebelumnya (*overnight culture*), diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm (Rahaju, 2014).

Filtrat Bakteriofag I dengan memindahkan 10 ml kultur bakteriofag yang telah diamplifikasi sebelumnya ke dalam tabung sentrifus lalu disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan disaring menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dihasilkan Filtrat Bakteriofag I (FB I). Pengkayaan FB I untuk sampel biofilm dan produk air dilakukan dengan menambahkan 4 mL FB I pada 1 ml media cair LB 10x, dan 5 ml kultur *Pseudomonas* sp. DA1 diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam pada *waterbath shaker*. Filtrat yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C (Rahaju, 2014).

Kultur inang 0,5% yang telah ditanam sebelumnya (*overnight culture*), diinokulasi ke 10 ml LB cair. Suspensi diinkubasi selama 2-3 jam dan *Optical Density* (OD) diukur per jam untuk mengetahui fase log. OD diukur secara spektrofotometri dengan panjang gelombang 600nm, apabila OD<sub>600nm</sub> yang

diperoleh 0,2 (awal fase log) dapat dipergunakan untuk *plating*.

Uji plak dilakukan pada enam tabung *ependorf* (1,5 ml) berisi 0,9 mL PBS ditambah 0,1 ml Filtrat Bakteriofag (FB I dan II) lalu dihomogenkan dengan membolak-balik tabung, dilakukan seri pengenceran sampai tabung ke enam. Enam *ependorf* masing-masing berisi 0,5 ml bakteri *Pseudomonas* sp. DA1 pada fase log ditambah masing-masing 0,1 ml dari setiap seri pengenceran pertama sampai ke enam, kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam *waterbath shaker* (suhu 37°C). *Plating* dilakukan dengan mencampurkan campuran yang telah diinkubasi ke dalam LB semi padat saat hangat-hangat kuku, divortex, dan dituangkan pada media LB padat. Hasil *plating* didiamkan selama 10 menit hingga memadat dan diinkubasi pada suhu 37° C hingga tumbuh demikian pula halnya untuk kontrol. Plak yang terbentuk pada cawan petri diamati (Rahaju, 2014).

Plak yang terbentuk dalam petri dihitung dengan cara menghitung plak yang terbentuk pada cawan petri. *Plaque form units* (PFU/ml) dilakukan untuk menentukan kuantifikasi atau perhitungan bakteriofag (Cann, 2005).

Analisis bakteriofag dilakukan dengan cara menghitung jumlah plak yang telah terbentuk dalam cawan petri dengan satuan *Plaque Forming Unit* (PFU). Bakteriofag disimpan dengan cara *scrub* isolat dan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* yang berisi larutan PBS sebanyak 1 ml, disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Isolat disimpan pada suhu 4°C.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Bakteri *Pseudomonas* sp.

Isolasi *Pseudomonas* sp dilakukan dengan 2 cara yaitu pengenceran dan filtrasi. Media yang digunakan untuk isolasi yaitu media selektif *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA). Media ini merupakan media selektif *Pseudomonas* dan juga sebagai media diferensial yang dapat membedakan *Pseudomonas aeruginosa* dengan *Pseudomonas* lainnya. *P. aeruginosa* memproduksi pigmen pyosianin (biru-hijau) yang dapat membedakan dengan *Pseudomonas* lainnya. Sehingga bakteri yang dapat tumbuh pada media PIA adalah bakteri *Pseudomonas*. Dari hasil isolasi didapatkan isolat *Pseudomonas* dari sampel biofilm pada depot air minum. Koloni yang tumbuh dengan ciri bakteri koloni berwarna kuning kehijauan dan berlendir dan kemudian dilakukan pewarnaan Gram.

Hasil yang diperoleh yaitu bakteri *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pendek dan berwarna merah pada saat pengamatan secara mikroskopis. Uji KIA menunjukkan hasil positif untuk *Pseudomonas* sp yaitu media berwarna merah tua. Warna merah dikarenakan bakteri tersebut tidak dapat memfermentasi glukosa dan laktosa, reaksi yang terjadi di dalam media yaitu reaksi alkali/basa, tidak terdapat gas dan H<sub>2</sub>S.

### Isolasi Bakteriofag

Isolat positif *Pseudomonas* sp. diremajakan terlebih dahulu pada media LB cair sebelum dilakukan isolasi bakteriofag. Isolat yang digunakan untuk isolasi bakteriofag adalah isolat dalam keadaan fase log. 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, 2011).

Uji konfirmasi bakteriofag spesifik yang dapat menginfeksi *Pseudomonas* sp. DA1 maka selain diujikan ke isolat *Pseudomonas* sp. DA1, bakteriofag juga diujikan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella* sp. (Koleksi dari LIPI). Hasil isolasi bakteriofag spesifik dapat dilihat pada Tabel 1.

No.	Isolat Inang	Asal	Pembentukan Plak
1	<i>Pseudomonas</i> sp. DA1	DAM (Isolat terpilih)	+
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kolam Ake Sentosa, Ternate (Koleksi LIPI)	-
3	<i>Salmonella</i> sp.	Teluk Ambon (Koleksi LIPI)	-

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa pada isolasi bakteriofag dengan beberapa isolat inang hanya pada isolat *Pseudomonas* sp. DA1 yang positif membentuk plak. Hasil yang diperoleh pada saat diuji dengan bakteri koleksi dari LIPI (*Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella* sp.), bakteriofag tersebut tidak dapat melisis bakteri tersebut yaitu ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening (plak). Tidak diperolehnya plak menggunakan inang selain *Pseudomonas* sp. DA1 dikarenakan bakteriofag tersebut tidak spesifik menginfeksi inang bakteri selain *Pseudomonas* sp. DA1.

Tiga lokasi pengambilan sampel yang berbeda di daerah Cibinong, Jawa

Barat menunjukkan bahwa ketiga lokasi yang dituju semuanya terdapat bakteriofag untuk *Pseudomonas* sp. Adanya bakteriofag ditandai dengan pembentukan zona lisis pada sebaran bakteri inang yang terlihat seperti zona bening (plak). Terbentuknya sejumlah plak menandakan jumlah fag yang menginfeksi dan melisis sel inang. Plak yang terlihat pada hasil penelitian memiliki karakteristik bulat, bening, dan memiliki cincin yang menjadi pembatas antara zona lisis dan bakteri inang.

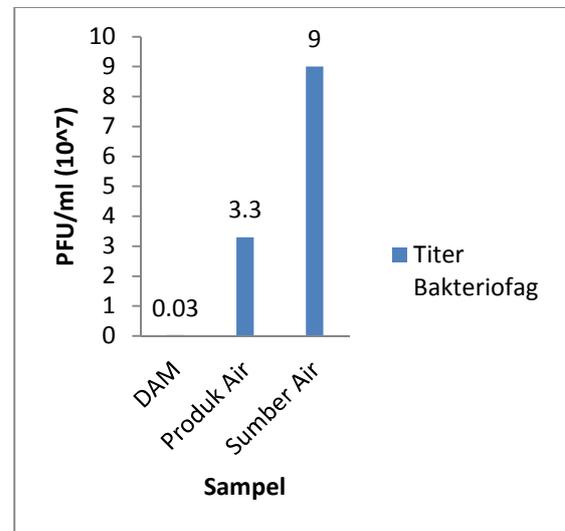


Gambar 1. Pembentukan plak akibat lisisnya sel inang

Hasil pengamatan bakteriofag dapat dilihat bahwa media LB yang mulanya berwarna kuning berubah menjadi warna hijau. Hal tersebut dikarenakan bakteri *Pseudomonas* tumbuh dan memproduksi pigmen.

Zona bening ini terbentuk akibat lisisnya sel bakteri inang oleh bakteriofag. Setiap plak hasil dari infeksi dinyatakan dalam bentuk *Plaque Form Unit* (PFU) (Cann, 2005). Plak yang terbentuk dihitung dengan cara menghitung plak pada cawan petri dengan satuan *Plak Forming Unit* (PFU/ml) untuk menentukan perhitungan fag. Perhitungan bakteriofag yang lisis dilakukan dengan menyebarkan bakteri pada permukaan media agar dalam cawan petri dan melakukan pengenceran pada filtrat bakteriofag. Analisis bakteriofag dilakukan dengan cara

menghitung jumlah plak yang telah terbentuk dalam cawan petri dengan satuan *Plaque Forming Unit* (PFU).



Gambar 2. Jumlah Titer Bakteriofag Tiap Sampel.

Hasil penelitian ini adalah ditemukannya bakteriofag pada tiap sampel sistem pengisian air minum isi ulang yang dapat melisis inang *Pseudomonas* sp DA1. Kemampuan fag melisis sel bakteri inangnya dapat dimanfaatkan untuk mengendalikan bakteri patogen. Sampel biofilm yang diambil dari Sumber Air dan Produk Air mempunyai jumlah bakteriofag lebih banyak dibandingkan dengan sampel biofilm dari DAM. Hal ini dimungkinkan karena adanya kontaminasi dari lingkungan sekitar, sterilisasi alat yang kurang memenuhi standar, kurang higienisnya pengolahan air dan jaringan pipa.

Isolat bakteriofag yang diperoleh merupakan bakteriofag spesifik yang dapat menginfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. DA1. Plak yang muncul membuktikan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp. dapat diinfeksi oleh bakteriofag dari sumber air, produk air minum dan DAM wilayah Cibinong.

## KESIMPULAN

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 *Pseudomonas*. Bakteri *Pseudomonas* yang dipilih untuk dilakukan isolasi bakteriofag yaitu *Pseudomonas* sp. DA1 yang diperoleh dari Depot Air Minum. Setiap sampel yang digunakan untuk isolasi bakteriofag ditemukan bakteriofag dengan ditandai adanya zona bening (plak). Isolat bakteriofag yang diperoleh dari hasil isolasi merupakan bakteriofag spesifik yang dapat menginfeksi *Pseudomonas* sp. DA1.

## DAFTAR PUSTAKA

- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A. 2003. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis.* 87: 949-54
- Buana, E. O. G. 2014. Isolasi Bakteriofag Litik sebagai Agen Biosanitasi pada Proses Pelisisan Bakteri Pembentuk Biofilm. *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* Vol. 2. Hal. 36-42.
- Brock, T. D., Madigan, M. T. 2011. *Biology of Microorganisms. Sixth edition.* Prentice Hall International. Inc.
- Brooks, G. F., J. S. Butel., S. A. Morse. 2013. *Medical Microbiology.* New York: Mc Graw Hill.
- Cann, J. Alan. 2005. *Principles of Molecular Virology.* USA: Elsevier Academic Press.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2002. *Syarat-Syarat Dan Pengawasan Kualitas Air Minum.* PERMENKES NO. 907/MENKES/SK/VII/2002.
- Nurizkiawan, Z. 2011. Isolasi Bakteriofag dan Aplikasinya Dalam Mengendalikan Bakteri Patogen Untuk Meningkatkan Keamanan Pangan. *Skripsi.* Malang: Universitas Brawijaya.
- Prakash, B. M., Veeregowda., G. Krishnappa. 2003. Biofilms: A Survival Strategy of Bacteri. *Current Sci.,* 85: 1299-1307.
- Pratt, R., Pellowe, C., Wilson, J. 2007. National Evidence-Based Guidelines for Preventing Healthcare-Associated Infection in Nhs Hospital in England. *Journal of Hospital Infection.* Vol. 2.
- Rahaju, S. H. 2014. Metoda Pengkayaan, Filtrasi dan Pertumbuhan untuk Isolasi Bakteriofag Spesifik *Salmonella typhimurium* pada Sampel Air. *Prosiding Sains, Teknologi dan Kesehatan.* Bogor: LIPI.
- SNI. 2006. Air Minum Dalam Kemasan. Standar Nasional Indonesia, SNI 013553-2006. Badan Standar Nasional.