

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG
SPESIFIK *Escherichia coli* ATCC 25922 DAN POTENSINYA
SEBAGAI AGEN ANTIBIOFILM**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna Memperoleh
Gelar Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Oleh: **Anton Tubagus Satrio**

NIM. 2008016001

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG**

2024

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Anton Tubagus Satrio

NIM : 2008016001

Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 dan Potensinya sebagai Agen Antibiofilm

Secara keseluruhan merupakan hasil penelitian/karya sendiri, kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 18 Desember 2024
Pembuat Pernyataan

A circular stamp with a red border and some text inside, partially obscured by a large, stylized handwritten signature in black ink.

Anton Tubagus Satrio

NIM. 2008016001



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngaliyan Semarang
Telp.024-7601295 Fax.7615387

PENGESAHAN

Naskah tugas akhir berikut ini:

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag Spesifik
Escherichia coli ATCC 25922 dan Potensinya
sebagai Agen Antibiofilm

Nama : Anton Tubagus Satrio

NIM : 2008016001

Jurusan : S1 Biologi

Telah diujikan dalam sidang tugas akhir oleh Dewan Penguji
Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang dan
dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
sarjana dalam ilmu biologi.

Semarang, 3 Januari 2025

DEWAN PENGUJI

Ketua Sidang,

Andang Syaifudin, M.Sc.
NIP. 198907192019031010

Penguji I

Dr. Dian Ayuning Tyas, M. Biotech
NIP. 198412182011012004

Pembimbing I

Andang Syaifudin, M.Sc.
NIP. 198907192019031010

Sekretaris Sidang

Galih Kholifatun Nisa', M.Sc.
NIP. 199006132019032018

Penguji II

Asri Febriana, M.Si.
NIP. 198902012019032015

Pembimbing II

Ruby Setiawan, M.Si.
NIP. 19870627015021001

NOTA DINAS

Semarang, 13 Desember 2024

Yth. Ketua Program Studi Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo Semarang

Assalamualaikum Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan, dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag
Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922
dan Potensinya sebagai Agen Antibiofilm

Penulis : Anton Tubagus Satrio

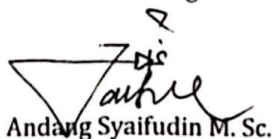
NIM : 2008016001

Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam siding Munaqosyah.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Pembimbing 1



Andang Syaifudin M. Sc.

NIP. 198907192019031010

NOTA DINAS

Semarang, 17 Desember 2024

**Yth. Ketua Program Studi Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo Semarang**

Assalamualaikum Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan, dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag
Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 dan
Potensinya sebagai Agen Antibiofilm

Penulis : Anton Tubagus Satrio

NIM : 2008016001

Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang Munaqasyah.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Pembimbing 2



Ruby Setiawan, M. Si.

NIP. 19870627015021001

ABSTRAK

Sejumlah strain *Escherichia coli* bersifat patogen, seperti *E. coli* dari kelompok *diarrheagenic E. coli* (DEC) yang dapat menyebabkan infeksi diare. Pengobatan umum untuk infeksi ini biasanya dilakukan dengan pemberian antibiotik, namun penggunaan antibiotik sering kali menghadapi masalah resistensi. Salah satu penyebab resistensi ini adalah kemampuan bakteri membentuk biofilm sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti stres lingkungan, kekurangan nutrisi, dan paparan antibiotik. Biofilm terdiri dari koloni bakteri yang terikat dan dikelilingi oleh matriks ekstraseluler yang dikenal sebagai *extracellular polymeric substance* (EPS), yang menghambat penetrasi antibiotik, sehingga membuat bakteri lebih sulit diobati. Masalah biofilm dapat diatasi dengan menggunakan agen antibakteri yang mampu mendegradasi biofilm melalui mekanisme yang berbeda dari antibiotik. Bakteriofag merupakan kandidat potensial karena memenuhi persyaratan tersebut. Bakteriofag menghasilkan enzim polisakarida lyase yang mampu mendegradasi senyawa *extracellular polymeric substance* (EPS) dalam biofilm. Penelitian ini mengisolasi bakteriofag dari sampel air limbah di Kota Semarang dan menguji kemampuannya sebagai agen antibiofilm *E. coli* ATCC 25922 serta mengkaraktirisasi bakteriofag hasil isolasi melalui uji *plaque assay*, *host range*, *one-step growth*, dan analisis morfologi menggunakan TEM (*transmission electron microscopy*). Hasil penelitian menunjukkan bakteriofag S16 memiliki aktivitas tertinggi dalam menghambat pembentukan biofilm *E. coli* ATCC 25922 sebesar 93,32%, sedangkan bakteriofag S3 menunjukkan aktivitas eradikasi tertinggi sebesar 39,8%. Uji *host range* menunjukkan bakteriofag S3 memiliki spektrum lisis yang

lebih luas dibandingkan isolat fag lainnya yang dapat menginfeksi *E. coli* ATCC 25922 dan tiga strain *E. coli* NBRC (12713, 13965, dan 13168). Analisis kurva *one-step growth* menunjukkan bakteriofag S3 memiliki periode laten lebih panjang (80 menit) dibandingkan S16 (50 menit), sedangkan ukuran *burst size* bakteriofag S16 (56,1 PFU/sel) lebih besar dibandingkan S3 (14 PFU/sel). Analisis morfologi menggunakan mikroskop transmisi elektron mengungkapkan bahwa bakteriofag S3 termasuk famili *Siphoviridae*, sedangkan S16 termasuk famili *Myoviridae*. Temuan ini menegaskan bahwa bakteriofag S16 dan S3 memiliki potensi yang signifikan sebagai agen antibiofilm terhadap *E. coli* ATCC 25922

Kata kunci: *Escherichia coli* ATCC 25922, biofilm, bakteriofag.

ABSTRACT

Several strains of Escherichia coli are pathogenic, such as E. coli from the diarrheagenic E. coli (DEC) group, which can cause diarrheal infections. The common treatment for these infections is usually through antibiotic administration, but antibiotic use often faces resistance issues. One of the causes of this resistance is the bacteria's ability to form biofilms as a defense mechanism against unfavorable environments, such as environmental stress, nutrient deprivation, and antibiotic exposure. Biofilms consist of bacterial colonies that are attached and surrounded by an extracellular matrix known as extracellular polymeric substance (EPS), which inhibits the penetration of antibiotics, making the bacteria more difficult to treat. The biofilm problem can be addressed by using antibacterial agents capable of degrading biofilms through mechanisms different from those of antibiotics. Bacteriophages are potential candidates because they meet these requirements. Bacteriophages produce polysaccharide lyase enzymes capable of degrading the extracellular polymeric substance (EPS) compounds in biofilms. This study isolated bacteriophages from wastewater samples in Semarang City and tested their ability as anti-biofilm agents against E. coli ATCC 25922, as well as characterizing the isolated bacteriophages through plaque assay, host range, one-step growth, and morphological analysis using transmission electron microscopy (TEM). The results showed that bacteriophage S16 had the highest activity in inhibiting biofilm formation of E. coli ATCC 25922 at 93.32%, while bacteriophage S3 showed the highest eradication activity at 39.8%. Host range testing showed that bacteriophage S3 had a broader lysis spectrum compared to other phage isolates, being able to infect E. coli ATCC 25922 and three E. coli NBRC strains (12713, 13965, and 13168). One-step growth curve analysis revealed that bacteriophage S3 had a longer latent period (80 minutes) compared to S16 (50 minutes), while the burst size of

bacteriophage S16 (56.1 PFU/cell) was larger than S3 (14 PFU/cell). Morphological analysis using transmission electron microscopy revealed that bacteriophage S3 belongs to the Siphoviridae family, while S16 belongs to the Myoviridae family. These findings confirm that bacteriophages S16 and S3 have significant potential as anti-biofilm agents against E. coli ATCC 25922.

Keywords: *Escherichia coli ATCC 25922, biofilm, bacteriophage.*

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT, yang telah memberikan cinta, kekayaan, dan rasa percaya diri sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir berupa skripsi dengan judul **“Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 dan Potensinya sebagai Agen Antibiofilm”**.

Shalawat dan salam semoga selalu tercurahkan ke haribaan Rasulullah Muhammad Saw., beserta keluarga, dan para sahabatnya yang mulia.

Pada bagian kata pengantar ini penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih yang tidak ternilai untuk semua pihak yang turut serta memberikan bantuan sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Ucapan terimakasih penulis tujukan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Nizar, M.Ag., selaku Rektor UIN Walisongo Semarang;
2. Bapak Prof. Dr. Mushadi, M.Ag., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang;
3. Ibu Dr. Dian Ayuningtyas, M. Biotech., selaku Ketua Program Studi Biologi UIN Walisongo Semarang;
4. Bapak Andang Syaifudin, M. Sc., selaku dosen pembimbing I, saya ucapkan banyak terima kasih atas perhatian dan

- pengetahuan yang telah diberikan baik terkait penulisan skripsi maupun pengelolaan mental penulis;
5. Ruby Setiawan, M. Si., selaku peneliti BRIN sekaligus pembimbing II yang dengan teliti dan sabar memberikan masukan dan arahan terkait teknik-teknik pada penelitian ini;
 6. Seluruh Tim Dosen Biologi yang telah memberikan arahan dan dukungan selama proses perkuliahan dan pelaksanaan Tugas Akhir ini (skripsi);
 7. Pihak *Indonesian Culture Collection* (InaCC) Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong yang telah memberikan izin dan kesempatan untuk melakukan penelitian terkait Tugas Akhir (skripsi);
 8. Group makan Prokariotik, terutama *research assistant* BRIN-InCC; Kak Farel, Kak Hasna, Kak Izuli, Kak Hikmah dan teman-teman riset TA BRIN;
 9. Teman-teman Biosternum, PP. Al-Ghuroba, PP. Al-Firdausy yang telah memberi ruang bagi penulis sehingga tidak lagi merasa kesepian selama sisa masa perpanjangan semester;
 10. Kedua orang tua penulis yang senantiasa memberi dukungan penuh baik materi, emosi, spiritual, sosial sehingga penulisan skripsi yang cukup banyak ini bisa selesai.

x

Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan kesalahan, karena itu segala kritik dan saran yang dapat membangun demi penyempurnaan skripsi ini.

x

DAFTAR ISI

PERNYATAAN KEASLIAN	i
PENGESAHAN.....	ii
NOTA DINAS.....	iii
NOTA DINAS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	19
A. Latar Belakang.....	19
B. Rumusan Masalah.....	25
C. Tujuan Penelitian.....	25
D. Manfaat Penelitian	26
BAB II LANDASAN PUSTAKA	28
A. Kajian Teori.....	28
1. <i>Escherichia coli</i>	28
2. Karakteristik Bakteri <i>Escherichia coli</i>	28
3. Biofilm	32
4. Bakteriofag	44
BAB III METODE PENELITIAN	74
A. Jenis Penelitian	74
B. Tempat dan Waktu Penelitian.....	75
C. Alat dan Bahan	75
D. Metode	78
1. Preparasi Sampel (Franswinsly & Savira, 2023)	78
2. Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag Spesifik <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Poxleitner <i>et al</i> , 2018)	78

3. Propagasi dan Kuantifikasi Bakteriofag (Poxleitner <i>et al.</i> , 2018)	80
4. Uji Kisaran Inang Bakteriofag (Poxleitner <i>et al.</i> , 2018)	84
5. Uji Antibiofilm (Haney <i>et al.</i> , 2021).....	84
6. Uji <i>One step growth</i> Bakteriofag (Kropinski, 2018). 90	
7. Karakterisasi Morfologi Bakteriofag Menggunakan <i>Transmission Electron Microscopy</i> (phagesdb.org)	92
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	94
A. Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag Spesifik <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	94
1. Isolasi Bakteriofag Spesifik <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	94
2. Purifikasi Bakteriofag	104
B. Uji Kisaran Inang Bakteriofag Spesifik <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	108
C. Hasil Uji Antibiofilm.....	113
1. Hasil Uji Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	113
2. Hasil Uji Inhibisi dan Eradikasi Biofilm <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	117
D. Kurva <i>One step growth</i> Bakteriofag Spesifik <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	123
E. Karakterisasi Morfologi Bakteriofag Spesifik <i>Eshcerichia coli</i> ATCC 25922 Menggunakan Mikroskop Transmisi Elektron (TEM).....	126
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	130
A. Kesimpulan.....	130
B. Saran	132
DAFTAR PUSTAKA	133
LAMPIRAN.....	141
RIWAYAT HIDUP	182

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Kajian penelitian yang relevan	69
Tabel 2. 2 Lanjutan.....	70
Tabel 2. 3 Lanjutan.....	71
Tabel 2. 4 Lanjutan.....	72
Tabel 2. 5 Lanjutan.....	73
Tabel 3. 1 Kategori pembentukan biofilm	86
Tabel 4. 1 16 Karakter plak bakteriofag spesifik <i>E. coli</i> ATCC 25922 setelah purifikasi putaran ke 3.....	105
Tabel 4. 2 Hasil uji kisaran inang <i>E. coli</i> ATCC 25922	108
Tabel 4. 3 Hasil uji pembentukan biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	113
Tabel 4. 4 Titer fag yang digunakan pada pengujian eradikasi biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	120

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1	Tahap pembentukan biofilm (Chen <i>et al.</i> , 2018)	35
Gambar 2. 2	Beberapa jenis fag (Budiarti & Rusmana, 2018).....	45
Gambar 2. 3	Struktur virus kompleks. Bakteriofag T4	46
Gambar 2. 4	Gambaran umum replikasi virus (Sulupadang <i>et al.</i> , 2021).....	47
Gambar 2. 5	Kurva pertumbuhan satu tahap/siklus fag.....	49
Gambar 2. 6	Siklus litik dan lisogenik (Sulupadang <i>et al.</i> , 2021).....	50
Gambar 2. 7	Morfotipe virus prokariot.....	52
Gambar 2. 8	Tiga famili fag yang mempunyai ekor (Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae) (Elbreki 2014; Budiarti & Rusmana, 2018).....	53
Gambar 2. 9	Metode <i>double layer</i> (dua lapis agar).....	55
Gambar 2. 10	Morfologi bakteri dan fag diamati dengan <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM). (a) Bakteri tanpa perlakuan fag. (b) Bakteri diberi perlakuan fag, terlihat fag menempel pada permukaan sel bakteri yang ditunjukkan dengan tanda panah. (c) fag menginfeksi bakteri sehingga lisis atau hancur ditunjukkan dengan lingkaran (Budiarti & Rusmana, 2018).....	56
Gambar 2. 11	Contoh perbedaan morfologi plak: (a) plak ukuran besar dan memiliki halo. (b) plak ukuran sedang dan memiliki halo. (c) plak ukuran kecil dan tidak memiliki halo (Budiarti & Rusmana, 2018).....	58
Gambar 2. 12	Contoh pemurnian fag. Fag heterogen memiliki lebih dari satu morfologi plak	

	(A). Setelah pemurnian, fag dengan plak kecil (B) dan besar (C) merupakan populasi homogen (Poxleitner <i>et al.</i> , 2018).....	59
Gambar 2. 13	Hasil <i>spot test</i> (Narulita <i>et al.</i> , 2018).....	61
Gambar 2. 14	Hasil <i>double layer</i> (Narulita <i>et al.</i> , 2018).....	61
Gambar 3. 1	Peta lokasi pengambilan sampel bakteriofag. Peta Jawa Tengah (A), Kota Semarang (B), Kecamatan Ngaliyan (C), Selokan jalan raya Ngaliyan, Semarang (D), Selokan rumah makan Tanjung Sari, Ngaliyan, Semarang (E), Selokan Laboratorium Kampus 3 Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang (F), Selokan tempat pemotongan ayam di pasar Ngaliyan, Semarang (G),	77
Gambar 3. 2	<i>Plaque assay/ double layer</i> (Budiarti & Rusmana, 2018).....	80
Gambar 3. 3	Contoh Perlakuan <i>Spot Test</i> (Dokumen Penelitian, 2024).....	81
Gambar 3. 4	Metode <i>One step growth</i> (OSG) <i>experiment</i> (Kropinski, 2018).....	92
Gambar 4. 1	Morfologi plak bakteriofag dari sampel fag S4 hasil isolasi langsung (Dokumentasi Penelitian, 2024).....	96
Gambar 4. 2	Hasil uji <i>spot test/small drop</i> dari sampel fag SJR (a) SRM (b), SL (c) dan SPA (d)	97
Gambar 4. 3	Hasil uji kisaran inang bakteriofag spesifik <i>E. coli</i> ATCC 25922 terhadap NBRC 12713, NBRC 13965, NBRC 13168.....	109
Gambar 4. 4	Bakteri <i>E. coli</i> ATCC 25922 (A), kontrol negatif (B) (Dokumentasi Penelitian, 2024).....	116

Gambar 4. 5 Aktivitas Inhibisi biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922 oleh bakteriofag (Dokumentasi Penelitian, 2024).	118
Gambar 4. 6 Aktivitas eradikasi biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922 oleh bakteriofag (Dokumentasi Penelitian, 2024).....	120
Gambar 4. 7 Kurva <i>one step growth</i> S3.....	123
Gambar 4. 8 Kurva <i>one step growth</i> S16.....	124
Gambar 4. 9 Morfologi bakteriofag spesifik <i>E. coli</i> ATCC 25922. Fag S3 (a), fag S16 (b) (Dokumentasi Penelitian, 2024).....	127

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Tabel 1. 1 16 Asal sampel, jenis metode, kode sampel fag, karakteristik fag spesifik <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	142
Lampiran Tabel 1. 2 16 plak bakteriofag hasil isolasi yang ditentukan untuk dipurifikasi	143
Lampiran Tabel 1. 2 Lanjutan	144
Lampiran Tabel 1. 2 Lanjutan	145
Lampiran Tabel 1. 2 Lanjutan	146
Lampiran Tabel 1. 2 Lanjutan	147
Lampiran Tabel 1. 2 Lanjutan	148
Lampiran Tabel 1. 2 Lanjutan	149
Lampiran Tabel 1. 2 Lanjutan	150
Lampiran Tabel 1. 3 Hasil uji <i>spot titer</i> fag	166
Lampiran Tabel 1. 3 Lanjutan	167
Lampiran Tabel 1. 3 Lanjutan	168
Lampiran Tabel 1. 3 Lanjutan	169
Lampiran Tabel 1. 3 Lanjutan	170
Lampiran Tabel 1. 4 Hasil pengukuran nilai absorbansi OD ₆₀₀ dengan pengukuran jumlah sel bakteri <i>E. coli</i> ATCC 25922 (CFU/mL).....	172
Lampiran Tabel 1. 6 Hasil uji <i>one step growth</i> fag S3 (1X10 ⁶ PFU/mL)	173
Lampiran Tabel 1. 7 Hasil uji <i>one step growth</i> fag S16 (1X10 ⁵ PFU/mL)	175
Lampiran Tabel 1. 8 Hasil uji pembentukan biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922	177
Lampiran Tabel 1. 9 Peta Perlakuan pada uji inhibisi biofilm <i>E. coli</i> oleh bakteriofag di <i>Microplate Assay</i>	178
Lampiran Tabel 1. 10 Hasil perhitungan uji inhibisi biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922	179

Lampiran Tabel 1. 11 Peta sebaran perlakuan pada uji eradikasi biofilm <i>E. coli</i> ATCC	180
Lampiran Tabel 1. 12 Hasil perhitungan uji eradikasi biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	181
Lampiran Gambar 1. 1 Isolat bakteri <i>E. coli</i> ATCC 25922 .	141
Lampiran Gambar 1. 2 Air limbah selokan yang diduga mengandung bakteriofag spesifik <i>E. coli</i> ATCC 25922	141
Lampiran Gambar 1. 3 Hasil purifikasi sampel fag S1.....	151
Lampiran Gambar 1. 4 Hasil purifikasi sampel fag S2.....	152
Lampiran Gambar 1. 5 Hasil purifikasi sampel fag S3.....	153
Lampiran Gambar 1. 6 Hasil purifikasi sampel fag S4.....	154
Lampiran Gambar 1. 7 Hasil purifikasi sampel fag S5.....	155
Lampiran Gambar 1. 8 Hasil purifikasi sampel fag S6.....	156
Lampiran Gambar 1. 9 Hasil purifikasi sampel fag S8.....	157
Lampiran Gambar 1. 10 Hasil purifikasi sampel fag S9.....	158
Lampiran Gambar 1. 11 Hasil purifikasi sampel fag S10 ..	159
Lampiran Gambar 1. 12 Hasil purifikasi sampel fag S11 ..	160
Lampiran Gambar 1. 13 Hasil purifikasi sampel fag S13 ..	162
Lampiran Gambar 1. 14 Hasil purifikasi sampel fag S14 ..	163
Lampiran Gambar 1. 15 Hasil purifikasi sampel fag S15 ..	164
Lampiran Gambar 1. 16 Hasil purifikasi sampel fag S16 ..	165
Lampiran Gambar 1. 17 <i>Webbed plate</i> sampel fag S3.....	171
Lampiran Gambar 1. 18 <i>Webbed plate</i> sampel fag S16	171
Lampiran Gambar 1. 19 Perbandingan sampel fag hasil isolasi (a) dan hasil <i>Webbed plate</i> (b)	171
Lampiran Gambar 1. 21 Hasil uji inhibisi biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922 pada <i>Microplate Assay</i> 96 wells.....	178
Lampiran Gambar 1. 23 Hasil uji eradikasi biofilm <i>E. coli</i> ATCC 25922 pada <i>Microplate Assay</i> 96 wells.....	180

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sejumlah strain *Escherichia coli* bersifat patogen, seperti *E. coli* dari kelompok *diarrheagenic E. coli* (DEC) yang dapat menyebabkan infeksi diare (Rahayu, 2018). Pengobatan umum untuk infeksi ini biasanya dilakukan dengan pemberian antibiotik, namun penggunaan antibiotik sering kali menghadapi masalah resistensi. Salah satu penyebab resistensi ini adalah kemampuan bakteri membentuk biofilm sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti stres lingkungan, kekurangan nutrisi, dan paparan antibiotik (Triana, 2018). Biofilm terdiri dari koloni bakteri yang terikat dan dikelilingi oleh matriks ekstraseluler yang dikenal sebagai *extracellular polymeric substance* (EPS), yang dapat menghambat penetrasi antibiotik, sehingga membuat bakteri lebih sulit diobati (Waturangi, 2023).

Escherichia coli ATCC 25922 merupakan salah satu bakteri yang dapat membentuk biofilm selama proses pertumbuhannya (Brás *et al.*, 2024). Selain memiliki kemampuan membentuk biofilm, hasil penelitian Mursyida *et al.* (2023) menguji sensitivitas *E. coli* ATCC 25922 terhadap

berbagai antibiotik menunjukkan bahwa *E. coli* ATCC 25922 memiliki resistensi sebesar 73% terhadap ampisilin, 56% terhadap trimethoprim-sulfametoksazol, 43% terhadap kloramfenikol, dan 18% terhadap gentamisin. Temuan ini menggambarkan adanya hubungan antara kemampuan *E. coli* ATCC 25922 dalam membentuk biofilm dengan tingkat resistensinya terhadap antibiotik yang diuji.

Resistensi antibiotik, terutama yang disebabkan oleh biofilm, dapat diatasi dengan menggunakan agen antibakteri yang mampu mendegradasi biofilm melalui mekanisme yang berbeda dari antibiotik (Triana, 2018). Bakteriofag menjadi kandidat potensial karena dapat mendegradasi biofilm dengan menghasilkan enzim polisakarida lyase yang efektif menghancurkan senyawa *extracellular polymeric substance* (EPS) dalam biofilm (Pratiwi, 2021). Sejumlah penelitian mengenai pemanfaatan bakteriofag lokal sebagai agen antibiofilm telah dilakukan di Indonesia. Penelitian oleh Saefunida *et al.* (2016) melaporkan bahwa bakteriofag yang diisolasi dari sistem distribusi air minum isi ulang di Depok, Jawa Barat, menghasilkan enzim polisakarida lyase, yang mampu mencegah, menghambat, dan mengurangi lapisan biofilm *E. coli*. Penelitian lain oleh Triana (2018) menunjukkan bahwa fag EC RTH 04, yang diisolasi dari air toilet di Cimande, Bogor, Jawa Barat, menunjukkan aktivitas antibiofilm

termasuk pencegahan, penghambatan dan degradasi terhadap biofilm *E. coli* EC 3.

Selain memiliki mekanisme yang berbeda dari antibiotik dalam mengatasi biofilm, bakteriofag memiliki sejumlah keunggulan yang membedakannya dari antibiotik, diantaranya sifat spesifitasnya. Bakteriofag umumnya selektif dalam menghancurkan bakteri tanpa membahayakan organisme bermanfaat lainnya seperti flora usus, sehingga dapat mengurangi kemungkinan terjadinya disbiosis mikrobiota yang seringnya disebabkan oleh penggunaan antibiotik (Budiarti and Rusmana, 2018). Perbedaan lain antara bakteriofag dan antibiotik terletak pada waktu pengembangannya. Bakteriofag baru dapat diperoleh dalam hitungan hari atau minggu sementara antibiotik baru memerlukan waktu 10-15 tahun dan biaya lebih dari 1 miliar dolar untuk mencapai tahap siapa digunakan (Oved, 2021). Selain itu, bakteriofag dapat ditemukan di lingkungan manapun, termasuk tanah, air bahkan di dalam tubuh manusia. Bakteriofag adalah entitas yang paling melimpah di bumi, jumlahnya melebihi jumlah bakteri inangnya dengan perbandingan 10:1. Diperkirakan ada lebih dari 10^{32} bakteriofag di bumi (Gutiérrez, 2016). Layaknya antibiotik, bakteriofag juga dapat diproduksi dengan mudah di luar tubuh manusia (Budiarti and Rusmana, 2018).

Tren publikasi terkait penggunaan bakteriofag sebagai agen terapi dan biokontrol di luar negeri terus menunjukkan peningkatan setiap tahunnya selama sepuluh tahun terakhir, sebagaimana tercatat dalam pangkalan data Scopus. Di Indonesia, laporan penelitian mengenai bakteriofag masih sangat terbatas. Di tingkat ASEAN, data dari *ASEAN Microbial Database (AMIBASE)* menunjukkan bahwa Singapura telah mempublikasi 191 laporan penelitian mengenai isolat bakteriofag yang telah diidentifikasi dan dikarakterisasi. Malaysia mengikuti dengan 187 laporan, sementara Thailand mencatatkan 171 laporan mengenai isolat fag dan karakteristiknya. Sementara itu, Indonesia tidak memiliki data spesifik mengenai jumlah publikasi bakteriofag dalam database tersebut. Terdapat informasi bahwa jumlah laporan penelitian tentang bakteriofag di Indonesia masih sangat terbatas (Carascal *et al.*, 2022). Selain itu, koleksi bakteriofag di Indonesia yang dikelola oleh InaCC (*Indonesia Culture Collection*), yang merupakan pusat *depository* nasional untuk biakan mikroorganisme yang dikelola oleh Bidang Mikrobiologi Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), saat ini baru memiliki 12 isolat bakteriofag, semuanya berasal dari Jawa Barat (InaCC-BRIN, 2024).

Keterbatasan dalam publikasi dan koleksi bakteriofag ini menunjukkan pentingnya eksplorasi lebih lanjut terhadap

bakteriofag yang memiliki aktivitas sebagai agen antibiofilm. Isolasi dan karakterisasi merupakan langkah awal dalam upaya mengeksplorasi bakteriofag serta memaksimalkan potensinya, karena proses ini memungkinkan identifikasi fag yang spesifik terhadap bakteri target serta dapat memastikan keamanan penggunaannya melalui karakterisasi yang menyeluruh (Jo *et al.*, 2023). Tanpa adanya proses isolasi dan karakterisasi yang baik, pengembangan terapi fag tidak dapat dimaksimalkan karena tidak ada pemahaman mendalam tentang sifat dan kemampuan fag yang akan digunakan (Subramanian, 2024).

Berdasarkan uraian di atas, masalah tersebut mendorong peneliti untuk melakukan penelitian yang bertujuan mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922 serta mempelajari perannya sebagai agen antibiofilm. Dalam penelitian ini, *Escherichia coli* ATCC 25922 dipilih karena kemampuannya membentuk biofilm (Brás *et al.*, 2024).

Selanjutnya, sampel fag yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari air limbah yang berasal dari selokan jalan raya Ngaliyan Semarang, selokan rumah makan Tanjung Sari Ngaliyan Semarang, selokan Laboratorium FST UIN Walisongo Semarang, dan selokan tempat pemotongan ayam di Pasar Ngaliyan Semarang. Pemilihan lokasi pengambilan sampel ini disesuaikan dengan habitat alami bakteri *E. coli* sebagai inang

fag, karena bakteriofag umumnya ditemukan di lingkungan yang sama dengan bakteri inangnya (Budiarti & Rusmana, 2018). *E. coli* secara alami ditemukan di dalam saluran pencernaan hewan, termasuk manusia (Rahayu, 2018). Oleh karena itu, lokasi yang berhubungan dengan lingkungan tersebut, seperti selokan tempat pemotongan ayam pasar Ngaliyan, Semarang, menjadi pilihan untuk isolasi bakteriofag. Kemudian, *E. coli* dikenal juga sebagai bakteri kosmopolit, yang berarti ia dapat ditemukan di berbagai lingkungan, tidak hanya terbatas pada saluran pencernaan (Rahayu, 2018). Hal tersebut menunjukkan bahwa *E. coli* dapat bertahan di berbagai habitat, termasuk lingkungan yang mungkin terkontaminasi feses hewan, seperti selokan jalan raya Ngaliyan, Semarang; selokan rumah makan Tanjung Sari, Ngaliyan, Semarang; dan selokan laboratorium FST kampus 3 UIN Walisongo Semarang.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan koleksi bakteriofag di Indonesia serta memperkuat pemahaman dan penerapan bakteriofag sebagai solusi untuk mengatasi masalah biofilm.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, masalah yang diteliti dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana hasil isolasi bakteriofag spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 dari air limbah yang berasal dari selokan jalan raya Ngaliyan Semarang, selokan rumah makan Tanjung Sari Ngaliyan Semarang, selokan Laboratorium FST UIN Walisongo Semarang, dan selokan tempat pemotongan ayam di Pasar Ngaliyan Semarang?
2. Bagaimana karakteristik bakteriofag spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 yang berhasil diisolasi, baik dari segi morfologi plak, *host range*, *one step growth*, dan morfologi bakteriofag?
3. Bagaimana kemampuan bakteriofag spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam menghambat dan mengeradikasi biofilm yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* ATCC 25922?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi bakteriofag spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 dari air limbah selokan di jalan raya Ngaliyan Semarang, rumah makan Tanjung Sari Ngaliyan Semarang,

Laboratorium FST UIN Walisongo Semarang, dan tempat pemotongan ayam di Pasar Ngaliyan Semarang.

2. Menganalisis karakteristik bakteriofag *Escherichia coli* ATCC 25922 yang berhasil diisolasi, baik dari segi morfologi plak, *host range*, *one step growth*, dan morfologi bakteriofag.
3. Mengetahui efektivitas bakteriofag *Escherichia coli* ATCC 25922 sebagai agen antibiofilm dalam menghambat dan mengeradikasi biofilm yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* ATCC 25922.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Bakteriofag yang diperoleh dapat digunakan sebagai agen antibiofilm untuk *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. Memberikan informasi yang berguna kepada masyarakat mengenai karakteristik bakteriofag spesifik *Escherichia coli* serta potensinya sebagai agen antibiofilm dalam mengatasi biofilm *Escherichia coli* ATCC 25922.

Penelitian ini dapat menjadi referensi atau acuan bagi peneliti dan industri dalam mengenali karakteristik bakteriofag *Escherichia coli* ATCC 25922 serta mengembangkan potensinya

sebagai agen antibiofilm dalam pengendalian infeksi yang disebabkan oleh *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. *Escherichia coli*

2. Karakteristik Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) adalah bakteri yang umumnya hidup di saluran pencernaan manusia dan hewan. Bakteri *E. coli* juga dapat bertahan di luar tubuh manusia, dengan penyebaran utama melalui feses. Secara mikroskopis, *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang, dengan ukuran berkisar antara 1,0-1,5 μm x 2,0-6,0 μm . Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob, yang berarti dapat tumbuh baik dalam kondisi adanya oksigen maupun tanpa oksigen. Selain itu, *E. coli* dapat bergerak (motil) menggunakan flagela atau tidak motil, dan memiliki kemampuan untuk bertahan hidup di media dengan nutrisi terbatas (Rahayu, 2018).

Escherichia coli memiliki dinding sel yang tipis, yang terdiri dari lapisan peptidoglikan dan membran luar, hal tersebut menjadi ciri khas gram-negatif pada bakteri ini. Waktu regenerasi *E. coli* berkisar antara 30 hingga 87 menit, tergantung pada suhu lingkungan. Waktu regenerasi mengacu pada durasi yang dibutuhkan oleh bakteri untuk membelah

diri dan menggandakan jumlah selnya. Suhu optimum untuk pertumbuhan *E. coli* adalah 37°C, di mana bakteri ini memiliki waktu generasi terpendek, yaitu sekitar 30 menit (Rahayu, 2018).

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* menurut (Rahayu, 2018):

Kingdom : Prokaryotae
Divisi : Gracilicutes
Kelas : Scotobacteria
Ordo : Eubacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

a. Karakteristik Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 25922 adalah strain referensi yang digunakan secara luas dalam penelitian mikrobiologi dan pengujian laboratorium. Strain ini pertama kali diisolasi dari sampel klinis manusia pada tahun 1946 di Seattle, Amerika Serikat, dan telah distandarisasi oleh *American Type Culture Collection* (ATCC). Strain *E. coli* ATCC 25922 bersifat non-patogen karena strain ini tidak menghasilkan verotoksin dan

diklasifikasikan sebagai *Biosafety Level 1* (BSL-1), sehingga aman digunakan di laboratorium (Minogue *et al.*, 2014).

Strain *E. coli* ATCC 25922 memiliki serotipe O6 dan biotipe 1. Serotipe adalah klasifikasi bakteri berdasarkan struktur antigen permukaannya. Dalam hal ini, *E. coli* ATCC 25922 termasuk dalam serotipe O6, yang berarti memiliki O-antigen tipe 6. Dalam konteks penelitian bakteriofag, O-antigen ini sangat penting karena bisa menjadi reseptor spesifik yang dikenali oleh bakteriofag (ATCC, 2024). Biotipe adalah klasifikasi bakteri berdasarkan aktivitas biokimia atau fisiologi spesifiknya. Dalam hal ini, *E. coli* ATCC 25922 termasuk biotipe 1. Biotipe 1 menunjukkan bahwa strain ini memiliki karakteristik biokimia dan genetik yang terstandar seperti fermentasi laktosa dan produksi indol. Penentuan biotipe 1 pada *E. coli* ATCC 25922 penting dalam penelitian untuk memastikan bahwa strain tersebut memiliki pola metabolisme yang stabil dan terstandar, sehingga hasil eksperimen menjadi konsisten, dapat direproduksi, dan mudah dibandingkan dengan penelitian lain. Stabilitas ini juga mempermudah evaluasi awal efektivitas bakteriofag sebagai agen antibiofilm sebelum diuji pada strain *E. coli* lain yang lebih kompleks atau patogen (ATCC, 2024).

Strain *E. coli* ATCC 25922 digunakan secara luas sebagai kontrol positif dalam uji resistensi antibiotik karena sifatnya

yang sensitif terhadap berbagai antibiotik. Penggunaan strain ini penting untuk memastikan bahwa metode pengujian antibiotik berjalan dengan benar sesuai standar *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Sensitivitasnya terhadap antibiotik menjadikannya acuan untuk membandingkan efektivitas antibiotik baru atau untuk menguji resistensi pada strain klinis lainnya (ATCC, 2024). Meskipun secara umum *E. coli* ATCC 25922 adalah strain sensitif terhadap berbagai antibiotik, *E. coli* ATCC 25922 dapat menjadi resisten dalam kondisi tertentu. Penelitian yang dilakukan oleh Mursyida *et al.* (2023) menguji sensitivitas *E. coli* ATCC 25922 terhadap berbagai antibiotik dan hasilnya menunjukkan bahwa *E. coli* ATCC 25922 memiliki resistensi sebesar 73% terhadap ampisilin, 56% terhadap trimethoprim-sulfametoksazol, 43% terhadap kloramfenikol, dan 18% terhadap gentamisin.

Dalam konteks penelitian antibiofilm, *E. coli* ATCC 25922 mampu membentuk biofilm dalam kondisi tertentu (misalnya pada permukaan tertentu atau dalam media nutrisi rendah). Hal ini memungkinkan evaluasi awal aktivitas antibiofilm bakteriofag sebelum diuji pada biofilm yang dihasilkan oleh strain patogen. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Brás *et al.* (2024) menunjukkan bahwa *E. coli* ATCC 25922 dapat membentuk biofilm. Biofilm yang terbentuk

oleh *E. coli* ini dapat meningkatkan resistensi terhadap antibiotik hingga 10.000 kali dibandingkan dengan bentuk planktoniknya (Nasrollahian *et al.*, 2024).

E. coli ATCC 25922 berbentuk batang pendek (*bacillus*) (Sitanggang *et al.*, 2019). Panjang sel bakteri ini umumnya berkisar antara 1-3 mikrometer dan memiliki lebar sekitar 0,4-0,7 mikrometer (Rahayu, 2018). Ketika ditumbuhkan pada media agar, koloni *E. coli* ATCC 25922 biasanya berbentuk bulat, halus, dan berwarna putih hingga krem pucat (Sari, 2022).

3. Biofilm

a. Karakteristik Biofilm

Biofilm merupakan ekosistem mikroorganisme yang kompleks, yang terbentuk oleh satu atau lebih spesies yang terperangkap dalam matriks ekstraseluler. Matriks ini memiliki komposisi yang bervariasi, tergantung pada jenis permukaan serta spesies mikroorganisme yang mengkolonisasinya (Meyer, 2015). Mikroorganisme dalam biofilm sangat beragam, terdiri dari bakteri, jamur, dan organisme lainnya. Keberagaman ini memungkinkan biofilm untuk menempel pada berbagai jenis permukaan. Gabungan dari berbagai mikroorganisme yang membentuk biofilm meningkatkan ketahanannya terhadap berbagai desinfektan, termasuk biosida (Meyer, 2015).

Matriks ekstraseluler biofilm terdiri dari berbagai komponen, seperti polisakarida, protein, serta DNA ekstraseluler. Matriks ini mampu melekat pada berbagai jenis permukaan, baik itu permukaan keras seperti peralatan pengolahan pangan, maupun bahan biologis seperti sayuran, daging, dan buah-buahan (Flemming *et al.*, 2016).

Selain berfungsi sebagai pengikat yang memperkuat struktur biofilm, matriks ekstraseluler juga memungkinkan terjadinya proses difusi nutrisi dan oksigen untuk mendukung kelangsungan hidup mikroorganisme dalam biofilm. Matriks ini juga mengandung enzim-enzim ekstraseluler yang membantu mikroorganisme dalam memperoleh nutrisi, mentransfer molekul yang berperan dalam komunikasi sel, serta melindungi sel-sel biofilm dari bahan-bahan toksik (Galie *et al.*, 2018).

Pembentukan biofilm memberikan berbagai keuntungan bagi mikroorganisme. Dalam konteks pengolahan pangan, keberadaan biofilm meningkatkan ketahanan mikroorganisme secara fisik, misalnya terhadap proses pengeringan atau desikasi yang terjadi selama pengolahan. Selain itu, biofilm juga memberikan ketahanan mekanik, seperti perlindungan terhadap aliran air dalam pipa saluran. Mikroorganisme yang tidak melekat pada permukaan dapat terlepas akibat aliran air,

namun dengan terbentuknya biofilm, mikroorganismenya menjadi lebih tahan terhadap aliran air tersebut (Waturangi, 2023).

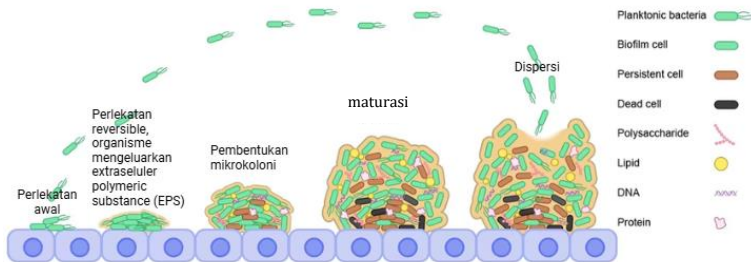
Tidak hanya ketahanan fisik dan mekanik, biofilm juga memberikan perlindungan kimia, terutama terhadap bahan kimia, senyawa antimikroba, dan desinfektan yang sering digunakan dalam industri pangan (Flemming, *et al.*, 2016).

b. Mekanisme Quorum Sensing

Pembentukan biofilm dimulai dengan mekanisme komunikasi antar sel bakteri yang dikenal sebagai *quorum sensing*. Dalam proses ini, bakteri mengatur ekspresi gen mereka berdasarkan jumlah sel yang ada dalam populasi. *Quorum sensing* melibatkan produksi dan deteksi molekul sinyal oleh bakteri, yang kemudian digunakan untuk mengoordinasikan perilaku kolektif mereka. Proses ini bergantung pada densitas sel dalam suatu populasi bakteri (Brackman & Coenye, 2014).

c. Proses Pembentukan Biofilm

Proses pembentukan biofilm dimulai dengan bakteri yang bertransisi dari bentuk planktonik yang bebas menuju bentuk sesil yang menempel pada permukaan. Perubahan ini mengarah pada modifikasi struktur dan fisiologi bakteri tersebut. Proses pembentukan biofilm dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2. 1 Tahap pembentukan biofilm (Chen *et al*, 2018)

Secara umum, pembentukan biofilm terdiri dari beberapa tahapan. Tahap pertama adalah pelekatan awal yang bersifat *reversible* pada permukaan. Tahap selanjutnya adalah pelekatan yang bersifat *irreversible* diikuti dengan pembentukan mikro-koloni, yang menjadi dasar awal perkembangan biofilm. Kemudian, terjadi maturasi biofilm yang membentuk struktur menyerupai bangunan. Tahapan terakhir adalah dispersi, di mana sel-sel yang telah matang akan melepaskan diri dari matriks dan kembali ke bentuk semula sebagai sel bebas (*planktonik*) (Coughlan, *et al*, 2016).

Mekanisme detail pembentukan dan pelepasan biofilm meliputi proses berikut:

1. Pelekatan Awal

Pada tahap ini, bakteri mulai menempel pada permukaan, yang menandai peralihan dari bentuk bebas

(*planktonik*) menjadi bentuk biofilm. Proses pelekatan ini bersifat sementara dan *reversible*, yang berarti bakteri dapat dengan mudah melepaskan diri dari permukaan. Interaksi yang terjadi pada tahap ini cukup lemah, meliputi ikatan van der Waals, daya elektrostatis, dan interaksi hidrofobik antara bakteri dan permukaan (Toyofuku, *et al.*, 2016).

Struktur seperti pili dan flagela, membantu bakteri menempel lebih kuat pada permukaan dan juga pada bakteri lainnya. Pelekatan yang baik biasanya terjadi pada permukaan yang kasar, bersifat hidrofobik, atau yang terlapis dengan bahan organik. (Donlan, 2002).

2. Pelekatan yang Bersifat *Reversible*

Pada tahap ini, mikroorganisme yang membentuk biofilm akan mengeluarkan matriks *extracellular polymeric substances* (EPS), yang kemudian membentuk kompleks dengan permukaan atau ligan spesifik. Ligan ini bertindak sebagai reseptor yang dapat terikat pada pili, fibril, atau keduanya. Setelah bakteri berhasil melekat, proses pelekatan *irreversible* pun dimulai, yang mengarah pada pembentukan kluster multilapis (Dunne, 2002).

Selama tahap pelekatan yang bersifat *irreversible*, terjadi perubahan struktural dan fisiologis yang signifikan pada bakteri yang melekat, termasuk hilangnya kemampuan motilitas pada sel-sel tersebut (Sauer, *et al.*, 2009).

3. Pembentukan Mikro-Koloni

Setelah bakteri menempel pada permukaan, beberapa di antaranya mulai bergabung membentuk kelompok kecil yang disebut mikro-koloni. Proses ini melibatkan pertumbuhan bakteri yang cepat, diikuti dengan produksi *extracellular polymeric substances* (EPS), yang berfungsi sebagai pengikat untuk mempertahankan bakteri tetap melekat pada permukaan tersebut. Begitu bakteri terikat dengan kuat, sejumlah bakteri akan mengeluarkan zat polimerik tambahan yang memperkuat ikatan mereka pada permukaan. Proses ini membantu pembentukan struktur biofilm yang lebih stabil (Dunne, 2002).

4. Pematangan Biofilm

Jika kondisi mendukung, biofilm akan berkembang menjadi struktur tiga dimensi yang menyerupai bentuk jamur atau bangunan, dengan saluran-saluran yang memungkinkan aliran nutrisi, oksigen, dan bahan penting lainnya. Saluran-saluran ini membantu difusi dan sirkulasi bahan-bahan tersebut ke seluruh lingkungan mikro dalam biofilm (Petrova & Sauer, 2012).

Perkembangan struktur biofilm ini dipengaruhi oleh densitas sel, yang diatur oleh sinyal kimia melalui mekanisme *quorum sensing*. Proses ini memungkinkan mikroorganisme untuk berkomunikasi dan mengatur perilaku mereka secara

kolektif, seperti sekresi faktor virulensi dan pembentukan biofilm itu sendiri (Scoffone *et al.*, 2019; Waturangi, D. E., 2023). Selain itu, komunikasi antar sel juga sangat penting dalam proses pelekatan dan pelepasan sel dari biofilm (Donlan & Costerton, 2002).

5. Pelepasan Biofilm

Pembentukan biofilm adalah proses yang bersifat siklik, di mana sel bakteri dapat melepaskan diri dari biofilm yang sudah matang dan kembali ke bentuk planktonik. Sel-sel yang terlepas ini kemudian mencari permukaan baru untuk melekat, memulai kembali siklus pembentukan biofilm. Pada tahap ini, mikroorganisme dihadapkan pada keputusan penting, yaitu apakah mereka akan tetap hidup dalam kelompok (sebagai biofilm) atau berpisah, keputusan ini sangat bergantung pada kondisi lingkungan sekitar (Kostakioti *et al.*, 2013).

Dari kontaminasi pangan, tahapan ini sangat penting untuk diperhatikan, karena proses dispersi ini dapat menyebabkan penyebaran mikroorganisme ke produk pangan yang dapat terkontaminasi.

d. Matriks Biofilm

Matriks biofilm terdiri dari tiga komponen utama, yaitu eksopolisakarida, protein ekstraseluler, dan DNA ekstraseluler.

Komponen-komponen ini dapat bervariasi, tergantung pada jenis bakteri yang membentuk biofilm. Penjelasan lebih lanjut mengenai eksopolisakarida, protein ekstraseluler, dan DNA ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri pembentuk biofilm akan dibahas lebih rinci berikut ini:

1. Eksopolisakarida

Eksopolisakarida merupakan salah satu komponen utama dalam matriks biofilm, dengan komposisi yang dapat bervariasi antara bakteri pembentuk biofilm. *Escherichia coli*, misalnya, menghasilkan eksopolisakarida berupa polimer B-1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA), yang memiliki peran penting dalam proses pelekatan sel-sel bakteri pada permukaan (Agladze *et al.*, 2005).

2. Protein Ekstraseluler

Matriks biofilm *Escherichia coli* juga mengandung protein curli yang disandikan oleh gen *csg*. Protein curli ini berperan penting dalam meningkatkan ketahanan bakteri terhadap kondisi pengeringan, serta membantu pelekatan sel pada permukaan (Smith *et al.*, 2017).

3. DNA Ekstraseluler

DNA yang berada di luar sel dikenal sebagai DNA ekstraseluler (eDNA). Dalam konteks biofilm, eDNA merujuk pada materi genetik yang terdapat di dalam matriks biofilm. eDNA memiliki peran penting dalam menjaga integritas

struktur biofilm, membantu proses pelekatan bakteri pada permukaan, serta mengikat logam. Selain itu, eDNA juga memberikan resistansi terhadap antibiotik dan mendukung transfer genetik horizontal antar mikroorganisme (Dunne, 2002).

e. Faktor yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm pada bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor yang dapat dikenali melalui mekanisme pengenalan intraseluler dan ekstraseluler. Salah satu faktor utama yang memengaruhi pembentukan biofilm adalah keterbatasan nutrisi. Dalam kondisi kekurangan nutrisi, bakteri cenderung membentuk biofilm sebagai respons untuk meningkatkan kelangsungan hidup mereka (Gerstel & Romling, 2003).

f. Dampak Pembentukan Biofilm

1). Peningkatan Resistensi

Biofilm yang terbentuk oleh *E. coli* dapat meningkatkan resistensi terhadap antibiotik hingga 1000 kali lipat dibandingkan dengan bakteri dalam bentuk planktonik. Hal ini disebabkan oleh keberadaan matriks ekstraseluler yang melindungi bakteri dari penetrasi antibiotik dan mengurangi efektivitas pengobatan. Ketika *E. coli* berada dalam biofilm, mereka juga dapat mengembangkan resistensi lebih cepat

ketika terpapar antibiotik, yang menyebabkan tantangan besar dalam pengobatan infeksi (Zhou *et al.*, 2022).

2). Infeksi Kronis

Biofilm *E. coli* sering berkontribusi pada infeksi kronis, seperti infeksi saluran kemih (ISK). Bakteri dalam biofilm dapat bertahan di dalam tubuh dan menyebabkan relaps atau infeksi berulang, yang sangat sulit untuk diobati (Sharma *et al.*, 2016).

3). Penyakit Bawaan Makanan

Biofilm *E. coli* juga menjadi masalah serius dalam industri makanan, di mana mereka dapat menyebabkan kontaminasi silang dan meningkatkan risiko penyakit bawaan makanan. Kehadiran biofilm pada peralatan pengolahan makanan membuat bakteri lebih tahan terhadap desinfektan, sehingga meningkatkan kemungkinan terjadinya kontaminasi dan infeksi pada konsumen (Zhou *et al.*, 2022).

4). Resistensi Antimikroba (AMR)

WHO mengidentifikasi resistensi antimikroba sebagai salah satu ancaman terbesar bagi kesehatan global, dengan biofilm sebagai salah satu faktor penyebab utama. Dalam konteks ini, biofilm *E. coli* berkontribusi pada peningkatan kasus AMR, yang mengakibatkan tantangan besar dalam

pengobatan infeksi yang disebabkan oleh patogen ini (Zhou *et al.*, 2022).

g. Strategi untuk Mengontrol Biofilm

1). Pemanfaatan Bakteriofag

Bakteriofag memiliki dua siklus hidup utama: siklus litik dan siklus lisogenik. Pada siklus litik, bakteriofag menginfeksi bakteri, berkembang biak di dalamnya, dan akhirnya menyebabkan sel bakteri pecah. Siklus ini sering dimanfaatkan dalam terapi karena kemampuannya untuk membunuh bakteri secara efektif. Sebaliknya, pada siklus lisogenik, bakteriofag menyisipkan materi genetiknya ke dalam kromosom bakteri dan tetap bertahan dalam keadaan tidur sampai kondisi tertentu memicu peralihan ke siklus litik (Budiarti & Rusmana, 2018). Karena kemampuannya ini, bakteriofag banyak digunakan dalam industri pangan untuk melawan bakteri patogen atau perusak pangan (Dewanggana *et al.*, 2022).

Bakteriofag tidak hanya memiliki kemampuan untuk membunuh bakteri, tetapi juga efektif dalam menghancurkan biofilm yang terbentuk. Setelah biofilm hancur, jumlah bakteriofaga akan berkembang biak dengan cepat. Hal ini disebabkan oleh banyaknya jumlah bakteri yang ada di dalam biofilm, yang menjadi sumber ideal bagi bakteriofag untuk berkembang (Gonzalez dan Calap, 2020 *as cited in* Waturangi,

D. E., 2023). Sel-sel bakteri yang terperangkap dalam biofilm justru lebih mendukung replikasi bakteriofag dibandingkan dengan sel-sel bakteri yang berada dalam kondisi planktonik (Harper *et al.*, 2014).

Bakteriofag dilengkapi dengan mekanisme ekspresi enzim depolimerase yang dapat merusak matriks EPS (eksopolisakarida) yang melindungi biofilm (Waturangi, D. E., 2023). Setelah merusak EPS, bakteriofag akan menginfeksi sel bakteri inang dan melakukan replikasi di dalamnya, menghasilkan jumlah progeni yang lebih banyak. Progeni bakteriofag yang berkembang dalam matriks biofilm kemudian akan menyebar dan menyerang bakteri lainnya, termasuk bakteri yang sedang mensintesis EPS, memperlemah struktur biofilm tersebut (Waturangi, D. E., 2023).

Bakteriofag juga memiliki kemampuan untuk menginfeksi sel bakteri yang dalam kondisi persisten atau dorman, yang bertahan di dalam sel inang. Ketika sel inang kembali aktif, bakteriofag akan teraktivasi dan melanjutkan proses infeksi (Sillankorva, *et al.*, 2011).

Aplikasi bakteriofag untuk penghancuran biofilm dapat dibagi menjadi empat kategori, yaitu: (1) terapi bakteriofag, baik menggunakan bakteriofaga tunggal maupun campuran (*cocktail*); (2) penggunaan bakteriofaga yang telah dimodifikasi secara genetik; (3) pemanfaatan enzim yang

diproduksi oleh bakteriofaga, seperti endolisin dan depolimerase, untuk menghancurkan biofilm; dan (4) kombinasi penggunaan bakteriofag dengan antibiotik (Gonzalez & Calap, 2020).

Pada penelitian Triana (2018) melaporkan bahwa bakteriofag EC RTH 04, yang diisolasi dari air toilet di Cimande, Bogor, Jawa Barat, memiliki aktivitas antibiofilm yang signifikan terhadap *E. coli* EC 3. Fag ini terbukti efektif baik dalam mencegah maupun menghambat pembentukan biofilm, serta mampu mengeradikasi biofilm yang telah terbentuk.

4. Bakteriofag

a. Struktur dan Morfologi Bakteriofag

Bakteriofag, seperti virus lainnya, terdiri dari beberapa makromolekul, yakni asam nukleat, protein, dan di beberapa jenis virus mengandung lipid.

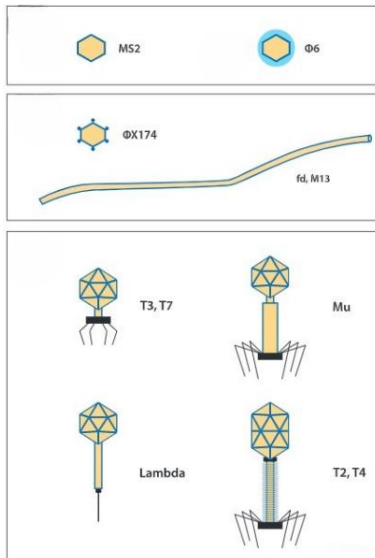
Fungsi protein yang menyusun virus adalah sebagai berikut :

1. Protein pembentuk kapsid/kapsomer: Protein ini berfungsi untuk membungkus genom (*DNA/RNA*) virus.
2. Protein membran: Berperan dalam membentuk membran virus dan mendukung interaksi dengan sel inang.
3. Protein sinyal pengenalan: Digunakan virus untuk mengenali dan menempel pada sel inang.

4. Enzim: Terlibat dalam berbagai proses, seperti replikasi genom dan pemrosesan protein virus.

Struktur dan morfologi bakteriofaga sangat bervariasi.

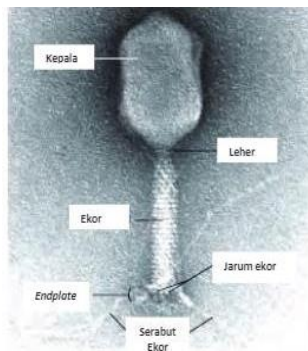
Berbagai jenis bakteriofaga dapat dilihat pada Gambar 2.2



Gambar 2. 2 Beberapa jenis fag (Budiarti & Rusmana, 2018)

Terdapat bakteriofag yang tidak hanya memiliki kepala yang simetris ikohedral, tetapi juga dilengkapi dengan ekor berbentuk helikal. Salah satu contohnya adalah bakteriofag T4 (lihat Gambar 2.3). Bakteriofag umumnya memiliki ukuran berkisar antara 24 hingga 200 nm, dan *fag* T4 menjadi yang terbesar, mencapai panjang sekitar 200 nm dan lebar antara 80 hingga 100 nm (Budiarti, 2018).

Ekor bakteriofag, yang terhubung dengan kapsid, memainkan peran penting dalam proses inisiasi infeksi, pengikatan, dan penetrasi virus ke dalam sel inang. Fungsi utama ekor bakteriofag adalah sebagai jembatan antara kapsid dan sel inang, memungkinkan asam nukleat dalam kapsid disalurkan melalui ekor ke dalam sitoplasma sel inang (Budiarti, 2018). Pada bakteriofag T4, ekornya dikelilingi oleh selaput kontraktil, yang memungkinkan ekor untuk berkontraksi dan memfasilitasi penetrasi ke dalam sel bakteri. Struktur dasar yang disebut *baseplate* terdapat pada bagian ekor, yang dilengkapi dengan serat-serat ekor. Serat-serat ekor ini memiliki peran penting dalam pengikatan bakteriofag pada permukaan sel bakteri, memungkinkan virus untuk melekat dan memulai proses infeksi (Budiarti, 2018).

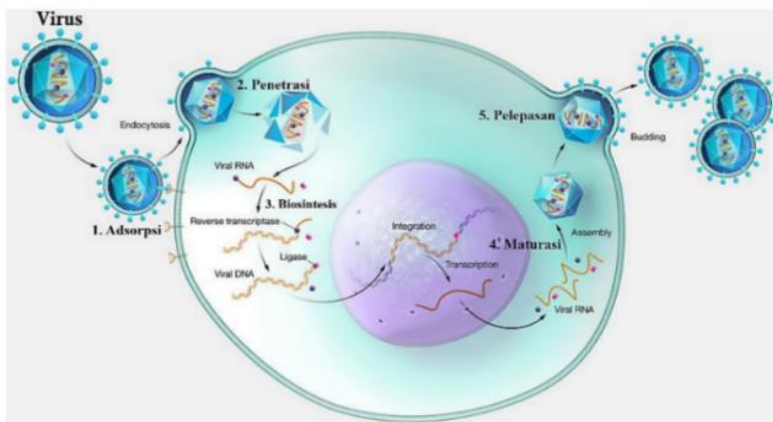


Gambar 2. 3 Struktur virus kompleks. Bakteriofag T4 (Budiarti, 2018)

b. Siklus Hidup Bakteriofag

1). Replikasi Bakteriofag

Secara umum, proses replikasi bakteriofag mirip dengan siklus replikasi virus pada umumnya dan terdiri dari enam tahap utama yang dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2. 4 Gambaran umum replikasi virus
(Sulupadang *et al.*, 2021)

1. Tahap Penempelan (Adsorpsi)

Pada tahap pertama, bakteriofag menempel pada permukaan sel bakteri menggunakan serat ekornya, yang berfungsi sebagai alat pengikat. Proses ini merupakan langkah awal dalam infeksi virus.

2. Tahap Penetrasi

Setelah menempel pada sel bakteri, bakteriofag menyuntikkan materi genetiknya (DNA) ke dalam sel bakteri. Hal ini dilakukan dengan membuat lubang pada dinding sel bakteri, memungkinkan virus untuk mengirimkan informasi genetik ke dalam sel inang.

3. Tahap Sintesis

Pada tahap ini, virus mulai mengendalikan aktivitas sel bakteri untuk memproduksi asam nukleat dan protein virus. Sintesis ini berlangsung dari awal hingga akhir infeksi, dengan produksi berbagai komponen virus yang diperlukan. Pada akhir tahap ini, protein struktural yang membentuk unit pembungkus virus (kapsomer) mulai disintesis.

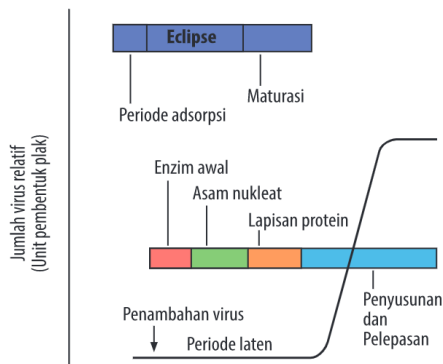
5. Tahap Perakitan

Setelah komponen virus seperti asam nukleat dan protein terbentuk, mereka akan dirakit menjadi partikel virus utuh. Proses ini melibatkan penggabungan berbagai bagian virus untuk membentuk virion yang siap untuk dilepaskan.

6. Tahap Lisis

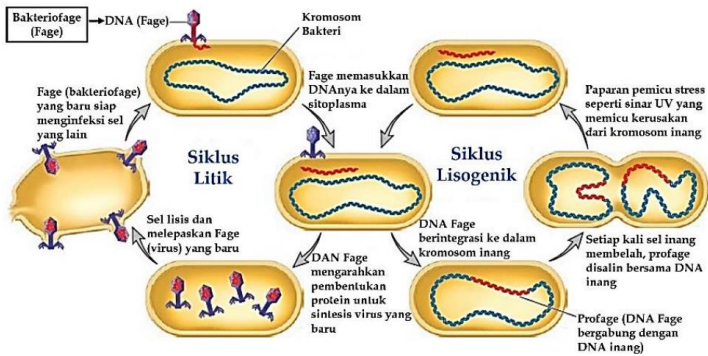
Pada tahap terakhir, bakteriofag menghasilkan enzim yang merusak dinding sel bakteri. Kerusakan ini menyebabkan sel bakteri pecah (*lysis*), melepaskan bakteriofag baru ke lingkungan. Virus-virus baru ini kemudian siap untuk menginfeksi sel bakteri lainnya (Pratiwi, 2021).

Tahapan-tahapan dalam replikasi bakteriofag dapat digambarkan melalui *One step growth Curve* atau kurva pertumbuhan satu tahap yang tertera pada Gambar 2.5. Kurva ini menggambarkan perbanyakan fag secara fisiologis, yang menunjukkan fase infeksi, sintesis, perakitan, dan lisis sel inang.



Gambar 2. 5 Kurva pertumbuhan satu tahap/siklus fag (Budiarti & Rusmana, 2018)

Berdasarkan virulensinya ada 2 jenis fag yaitu virulen atau litik dan temperate atau lisogneik. Kedua jenis virus ini dapat dilihat pada Gambar 2.6



Gambar 2. 6 Siklus litik dan lisogenik (Sulupadang *et al.*, 2021)

2). Siklus Litik

Fag litik (fag virulen) adalah bakteriofag yang menjalani siklus litik selama proses replikasinya (Davies; Hardanti, 2018). Dalam siklus litik, asam nukleat bakteriofag mengambil alih mesin biosintesis sel inang untuk mensintesis protein. Fag litik menyebabkan kematian sel inang melalui proses lisis yang terjadi pada akhir siklus hidup fag litik. Ada lima tahap siklus litik, yaitu adsorpsi, penetrasi, replikasi, perakitan, dan lisis (Budiarti & Rusmana, 2018).

3). Siklus Lisogenik

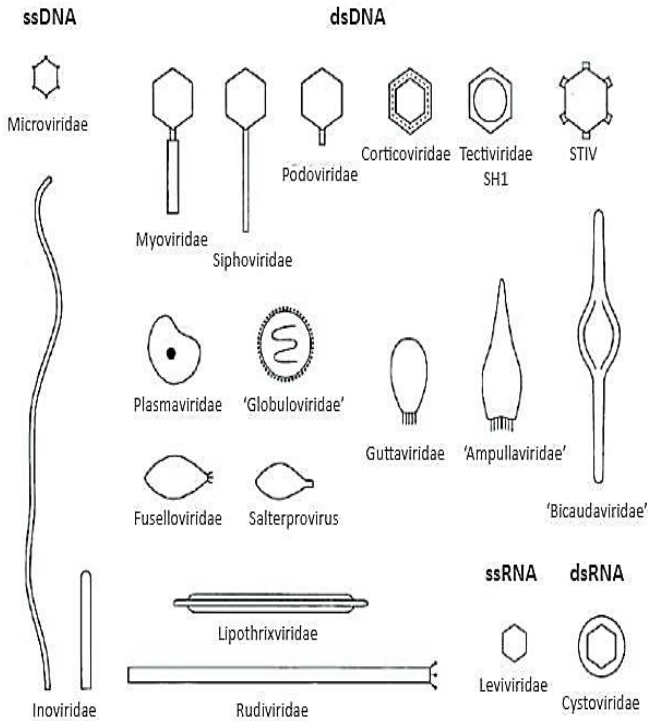
Siklus lisogenik terjadi ketika jumlah bakteriofag melebihi jumlah sel inang (Budiarti & Rusmana, 2018). Bakteriofag yang dapat berkembang melalui siklus ini dikenal sebagai fag *temperate*. Setelah memasuki sel inang, DNA fag

akan bergerak menuju sitoplasma sel. Di sini, fag temperate memiliki dua pilihan: melanjutkan ke siklus litik atau beralih ke siklus lisogenik. Dalam siklus lisogenik, DNA fag akan bergabung dengan kromosom bakteri inang, membentuk profag (Pratiwi, 2021).

Profag dapat mengubah sifat bakteri dan memberikan karakteristik baru pada keturunannya (Budiarti & Rusmana, 2018). Selama pembelahan sel, DNA fag akan terduplikasi bersama dengan kromosom bakteri inang. Durasi siklus lisogenik tidak terbatas, dan bakteri yang mengandung satu atau lebih *profag* disebut sebagai lisogen. Bakteri lisogen ini menjadi kebal terhadap infeksi fag litik. Namun, jika terjadi perubahan lingkungan yang ekstrem, seperti paparan sinar UV, bakteriofag dapat beralih ke siklus litik dan mulai merusak dinding sel bakteri inangnya (Budiarti & Rusmana, 2018).

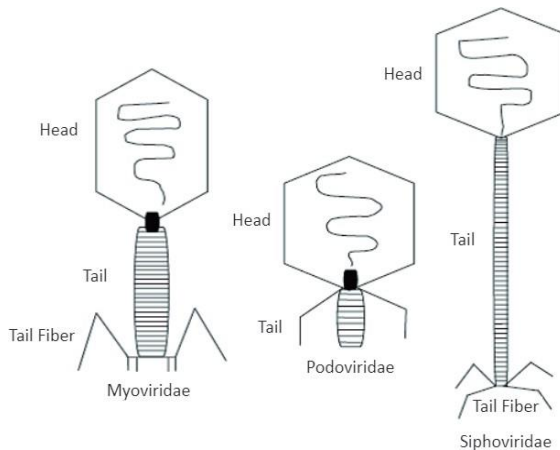
c. Klasifikasi Bakteriofag

Sistem klasifikasi bakteriofag modern ditetapkan oleh Komite Internasional untuk Taksonomi Virus (ICTV), yang bertanggung jawab dalam mengelola data virus yang telah teridentifikasi maupun yang baru ditemukan (Budiarti & Rusmana, 2018). ICTV secara resmi mengadopsi klasifikasi bakteriofag yang pertama kali diperkenalkan oleh Ackermann pada tahun 2003 yang dapat dilihat pada Gambar 2.7



Gambar 2. 7 Morfotipe virus prokariot (Ackermann., 2009).

Sebagian besar bakteriofag memiliki struktur yang terdiri dari kepala dan ekor (lihat Gambar 2.8). Sejak tahun 1959, sekitar 5.500 bakteriofag telah diteliti menggunakan mikroskop elektron. Berdasarkan penelitian tersebut, diketahui bahwa sekitar 95% dari fag yang diamati memiliki ekor, dilihat dari sudut pandang morfologis (Budiarti & Rusmana, 2018).



Gambar 2. 8 Tiga famili fag yang mempunyai ekor (Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae) (Elbreki 2014; Budiarti & Rusmana, 2018).

d. Eksplorasi dan Karakterisasi Bakteriofag

1). Sumber Bakteriofag

Sumber isolasi bakteriofag dapat diperoleh dari sampel padat maupun cair. Sampel padat yang biasa digunakan untuk isolasi fag meliputi feses, tanah, dan sedimen, sementara sampel cair dapat berasal dari air sungai, air laut, dan limbah cair rumah tangga (Kusmiatun *et al.*, 2015)

Lokasi pengambilan sampel sangat mempengaruhi keberhasilan isolasi fag. Pemilihan lokasi sampel harus disesuaikan dengan habitat bakteri inang fag. Sebagai contoh,

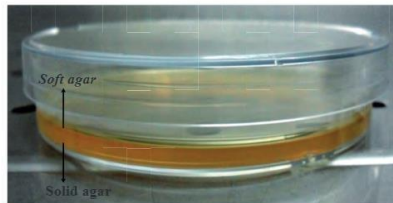
jika tujuannya adalah untuk mengisolasi fag yang dapat melisis *Escherichia coli*, maka sampel sebaiknya diambil dari lokasi yang banyak mengandung *E. coli* (Budiarti & Rusmana, 2018).

2). Isolasi dan Pengayaan Bakteriofag

Isolasi bakteriofag adalah proses pengambilan fag dari habitat aslinya untuk kemudian diperbanyak secara *in vitro*. Fag yang diisolasi dari alam umumnya terdapat dalam jumlah yang sangat sedikit. Oleh karena itu, dilakukan perlakuan pengayaan (*enrichment*) untuk memperoleh fag dalam jumlah yang lebih banyak. Pada proses pengayaan, bakteriofag ditumbuhkan bersama dengan bakteri inang dalam media cair yang mendukung pertumbuhan bakteri. Selama proses ini, fag akan langsung bereplikasi pada bakteri inangnya. Setelah pengayaan, bakteriofag dapat dipisahkan dari media dengan menggunakan metode filtrasi dan sentrifugasi (Budiarti & Rusmana, 2018).

Untuk mendeteksi keberadaan bakteriofag yang diisolasi dari alam, digunakan metode *double layer agar*. Metode ini melibatkan dua lapisan agar, yaitu lapisan atas berupa agar semi-solid (*soft agar*) dan lapisan bawah berupa agar solid. Media yang digunakan dalam metode ini adalah media selektif yang sesuai dengan bakteri inang, seperti media 802 yang digunakan untuk pertumbuhan *Escherichia coli* (Budiarti,

2018). Bentuk pengujian *double layer* dapat dilihat pada Gambar 2.9

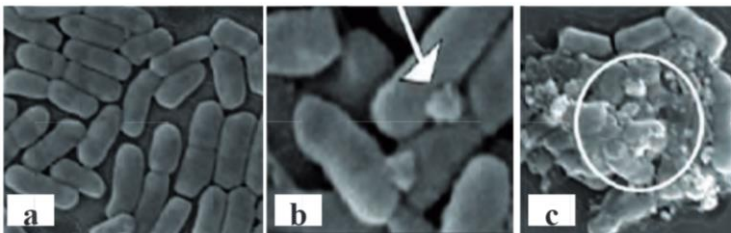


Gambar 2. 9 Metode *double layer* (dua lapis agar) (Budiarti & Rusmana, 2018).

Pada metode *double layer agar*, perbedaan utama antara dua lapisan agar terletak pada konsentrasi agar yang digunakan. Lapisan atas, yang disebut *overlay agar*, dibuat dengan konsentrasi agar 0,6%. Sedangkan lapisan bawah, yaitu agar solid, mengandung 2% agar. Perbedaan konsentrasi ini bertujuan untuk memfasilitasi difusi bakteriofag dalam media. Hal ini memungkinkan terbentuknya plak yang lebih besar, yang menjadi indikasi adanya infeksi fag pada sel bakteri. Lapisan agar bawah dibuat lebih padat karena memiliki fungsi sebagai penyangga. Lapisan ini mendukung lapisan atas selama proses pertumbuhan dan difusi bakteriofag, serta menjaga kestabilan struktur agar agar tidak mudah terganggu selama eksperimen (Budiarti & Rusmana, 2018).

Pada agar semi solid, zona kerusakan bakteri yang terjadi akibat infeksi bakteriofag disebut sebagai *plak*. Plak ini

menandakan bahwa sel bakteri telah mati atau mengalami lisis. Sebaliknya, area yang tetap keruh menunjukkan bahwa bakteri di wilayah tersebut masih hidup. Pada agar semi solid, zona kerusakan bakteri yang terjadi akibat infeksi bakteriofag disebut sebagai *plak*. Plak ini menandakan bahwa sel bakteri telah mati atau mengalami lisis. Sebaliknya, area yang tetap keruh menunjukkan bahwa bakteri di wilayah tersebut masih hidup (Budiarti, 2018). Proses lisis bakteri yang disebabkan oleh bakteriofag pada media cair dapat dilihat pada Gambar 2.10



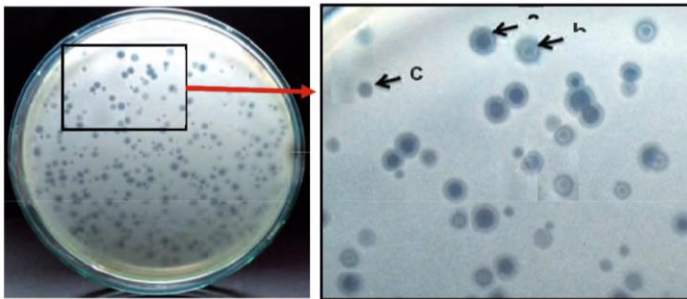
Gambar 2. 10 Morfologi bakteri dan fag diamati dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM). (a) Bakteri tanpa perlakuan fag. (b) Bakteri diberi perlakuan fag, terlihat fag menempel pada permukaan sel bakteri yang ditunjukkan dengan tanda panah. (c) fag menginfeksi bakteri sehingga lisis atau hancur ditunjukkan dengan lingkaran (Budiarti & Rusmana, 2018).

Menurut Budiarti & Rusmana (2018) ukuran plak yang terbentuk pada agar semi solid dapat bervariasi, tergantung pada beberapa faktor. Faktor utama yang mempengaruhi ukuran plak antara lain konsentrasi *soft agar*, jumlah populasi

bakteri, dan durasi inkubasi. Beberapa teknik dapat digunakan untuk memperbesar diameter plak yang terbentuk, di antaranya:

- a. Mengurangi konsentrasi agar pada media semi solid
Pengurangan konsentrasi agar bertujuan untuk memudahkan proses difusi bakteriofag dalam media. Dengan demikian, jangkauan infeksi fag menjadi lebih luas, yang memungkinkan fag untuk melisis bakteri inang dalam area yang lebih besar.
- b. Penggunaan Kultur Bakteri Inang Berumur 24 Jam
Kultur bakteri inang yang berumur 24 jam umumnya digunakan untuk tahap infeksi fag. Namun, setiap sel bakteri memiliki fase pertumbuhan yang berbeda. Fase logaritmik atau eksponensial adalah fase pertumbuhan yang paling ideal untuk menghasilkan plak dengan ukuran lebih besar.
- c. Menambahkan durasi inkubasi
Beberapa bakteriofag dari kelompok inang *Enterobacter*, seperti *E. coli*, menunjukkan peningkatan ukuran plak yang signifikan jika diinkubasi pada kondisi anaerob selama 24 jam, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pada kondisi aerob selama 16 jam. Teknik ini terbukti menghasilkan plak yang 2 hingga 8 kali lebih besar dibandingkan dengan inkubasi hanya dalam satu kondisi.

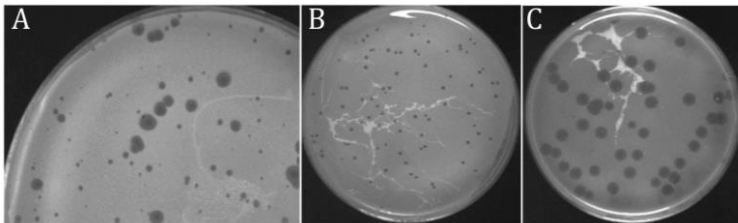
Bakteriofag dari satu sampel dapat memiliki berbagai jenis, yang terlihat dari perbedaan morfologi plak yang terbentuk (lihat Gambar 2.11). Secara umum, terdapat tiga tipe morfologi plak, yaitu plak jernih (*clear*), keruh (*turbid*), dan plak yang memiliki cincin luar (*halo*). Morfologi plak ini dapat memberikan petunjuk tentang jenis bakteriofag yang ada. Perbedaan antara fag litik dan fag lisogenik dapat diketahui dengan mengamati morfologi plak yang terbentuk. Fag litik umumnya menghasilkan plak yang jernih atau tembus cahaya, sedangkan fag lisogenik cenderung membentuk plak yang lebih samar atau keruh (Budiarti & Rusmana, 2018).



Gambar 2. 11 Contoh perbedaan morfologi plak: (a) plak ukuran besar dan memiliki halo. (b) plak ukuran sedang dan memiliki halo. (c) plak ukuran kecil dan tidak memiliki halo (Budiarti & Rusmana, 2018)

3). Purifikasi Bakteriofag

Kemurnian stok bakteriofag dapat diuji menggunakan metode *double agar overlay*. Bakteriofag yang telah murni biasanya menunjukkan morfologi plak yang seragam dan konsisten seperti yang terlihat pada Gambar 2.12



Gambar 2. 12 Contoh pemurnian fag. Fag heterogen memiliki lebih dari satu morfologi plak (A). Setelah pemurnian, fag dengan plak kecil (B) dan besar (C) merupakan populasi homogen (Poxleitner *et al.*, 2018)

4). Propagasi dan Kuantifikasi Bakteriofag Spesifik

Escherichia coli ATCC 25922

Bakteriofag hanya dapat bereplikasi di dalam sel inangnya. Proses produksi fag dilakukan dengan mencampurkan kultur bakteri inang dengan bakteriofag. Setelah itu, fag dipisahkan dari bakteri inangnya melalui proses sentrifugasi dan filtrasi menggunakan membran filter dengan pori 0,22 μm (Budiarti & Rusmana, 2018).

Jumlah bakteriofag biasanya dihitung dengan satuan *PFU* (*Plaque Forming Unit*), yang mengacu pada jumlah zona bening

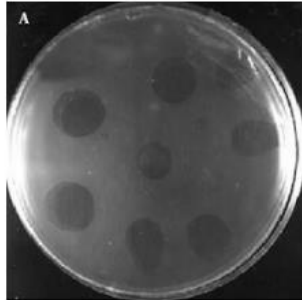
yang terbentuk pada media agar per 1 mL. Penentuan jumlah fag dalam suatu stok cairan fag dapat dilakukan dengan metode *plaque assay*, yang hasilnya dinyatakan dalam satuan *PFU/mL*.

Kuantifikasi bakteriofag dapat dilakukan dengan tiga metode utama, yaitu *double layer*, *direct plating*, dan *small drop*. Prinsip dasar dari ketiga metode ini adalah mencampurkan setiap pengenceran stok cairan fag dengan bakteri inang, kemudian disebar pada medium padat. Setelah masa inkubasi, bakteri inang akan tumbuh pada media, sementara bakteriofag yang mampu melisis bakteri inang akan menghasilkan zona bening atau transparan yang disebut plak. Plak ini kemudian dihitung untuk menentukan konsentrasi stok cairan fag, serta untuk membuat lisat (sampel fag dengan titer tinggi) (Poxleitner *et al.*, 2018). Terdapat dua metode utama yang dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi cairan stok fag, yaitu metode *double layer*, dan *small drop* (Budiarti & Kusmiatun, 2018). Deskripsi dari masing-masing metode tersebut adalah sebagai berikut:

a. Metode *Small Drop/Spot Test*

Metode *small drop* secara umum hampir mirip dengan *direct plating*. Namun, pada metode ini, cairan fag yang sudah diinokulasikan dengan bakteri inang tidak disebar ke seluruh permukaan media agar, melainkan hanya diteteskan pada satu

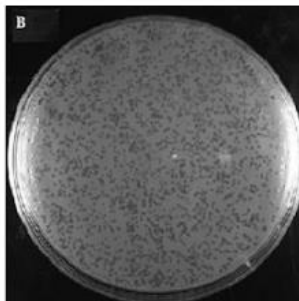
titik di atas permukaan media agar dalam cawan. Contoh hasil *spot test* dapat dilihat pada Gambar 2.13



Gambar 2. 13 Hasil *spot test* (Narulita *et al.*, 2018)

b. Metode *Double Layer*

Metode *double layer* yang digunakan untuk menghitung konsentrasi cairan fag pada dasarnya serupa dengan yang diterapkan pada tahap isolasi fag. Dalam metode ini, digunakan dua lapisan agar. Plak yang terbentuk pada lapisan atas media agar dihitung untuk mengetahui konsentrasi (titer) stok cairan fag. Contoh hasil uji *double layer* terlihat pada Gambar 2.14



Gambar 2. 14 Hasil *double layer* (Narulita *et al.*, 2018)

e. Karakterisasi Bakteriofag

1). *Host Range*

Pengujian kemampuan bakteriofag untuk menginfeksi berbagai inang atau spesies bakteri dikenal sebagai uji kisaran inang (*host range test*) (Hyman & Abedon, 2010 *as cited in* Handoko, 2021). Uji ini penting untuk memahami spektrum infeksi bakteriofag terhadap berbagai jenis bakteri. Langkah pertama dalam proses infeksi bakteriofag adalah *adsorpsi*, yaitu proses pelekatan bakteriofag pada sel inang. Pemahaman tentang *adsorpsi* ini sangat penting untuk mengembangkan teknologi bakteriofag yang lebih efektif. Secara umum, proses *adsorpsi* bakteriofag terdiri dari tiga tahap utama: kontak awal, pelekatan sementara yang dapat dibalik, dan pelekatan permanen yang tidak dapat dibalik (Duckworth & Gulig, 2002 *as cited in* Aji Handoko, 2021).

Pada tahap pertama, bakteriofag dan sel inang bertemu secara acak melalui gerakan sel bakteri, difusi, atau aliran Brown. Ini disebut dengan tumbukan acak antara kedua pihak (Høyland-Kroghsbo *et al.*, 2013 *as cited in* Aji Handoko, 2021). Setelah itu, pada tahap pelekatan sementara, bakteriofag mengikat permukaan sel inang namun ikatannya tidak permanen. Pada titik ini, bakteriofag dapat terlepas kembali dari permukaan sel inang jika tidak menemukan reseptor yang

sesuai. Proses ini memungkinkan bakteriofag untuk tetap berada dekat dengan sel inang sambil mencari reseptor yang tepat untuk pengikatan yang lebih kuat dan permanen (Hyman, 2019 *as cited in* Aji Handoko, 2021).

Penentuan kisaran inang bakteriofag dilakukan dengan cara menginfeksi fag ke berbagai jenis bakteri untuk melihat apakah fag tersebut dapat melisiskan bakteri inang tersebut. Salah satu metode yang umum digunakan untuk uji ini adalah metode *double layer* agar. Dalam pengujian ini, diharapkan bakteriofag bersifat spesifik dan hanya melisiskan bakteri patogen target, sehingga ketika diaplikasikan dalam kondisi *in vivo*, fag tidak akan merusak mikrobiota yang ada (Budiarti & Kusmiatun, 2018).

Penentuan kisaran inang bakteriofag sangat penting untuk mengetahui sejauh mana spesifisitas dan jangkauan fag dalam melisiskan bakteri. Kisaran inang ini dapat menunjukkan apakah bakteriofag tersebut memiliki spektrum yang sempit atau luas. Moreno Switt *et al.* (2013) *as cited in* Budiarti & Rusmana, (2018) mengklasifikasikan bakteriofag berdasarkan kisaran inangnya menjadi tiga kategori, yaitu:

1. Kisaran inang sempit: Bakteriofag ini hanya mampu melisiskan kurang dari 4 strain bakteri inang.
2. Kisaran inang luas: Bakteriofag ini mampu melisiskan antara 4 hingga 19 strain bakteri inang.

3. Kisaran inang sangat luas: Bakteriofag ini dapat melisiskan lebih dari 20 strain bakteri inang.

Setiap partikel bakteriofag memiliki kisaran inang tertentu, yaitu jenis atau strain bakteri yang dapat diinfeksi. Beberapa bakteriofag diketahui hanya dapat menginfeksi satu atau beberapa strain bakteri, sementara bakteriofag lainnya dapat menginfeksi lebih banyak spesies bakteri (Hyman dan Abedon, 2010 *as cited in* Aji Handoko, 2021).

- 2). Perhitungan *Multiple of Infection* (MOI)

Multiplicity of Infection (MOI) merujuk pada rasio antara jumlah agen infeksi bakteriofag dengan jumlah sel bakteri yang menjadi target infeksi. MOI merupakan metrik yang sangat penting dalam penelitian bakteriofag dan terapi fage, karena dapat membantu menentukan jumlah bakteriofag

$$\text{MOI} = \frac{\text{Total PFU/mL}}{\text{Total CFU/mL}}$$

Keterangan:

MOI : *Multiple of infection*
 Total PFU/mL : *Plaque Forming Units per mL*
 Total CFU/mL : *Colony Forming Units per mL*

yang dibutuhkan untuk menginfeksi sel bakteri. Sebagai contoh, jika 100 partikel fag diinokulasi ke dalam 10.000 sel bakteri, maka MOI dapat dihitung dengan cara berikut:

Pemahaman tentang MOI sangat krusial bagi peneliti bakteriofag, karena hal ini dapat membantu mengoptimalkan eksperimen infektivitas fag dan menentukan nilai MOI yang paling efektif untuk sistem fag-bakteri tertentu (Abedon., 2016; Handoko, 2021).

3). *One step growth* (OSG)

Mekanisme pertumbuhan bakteriofag satu langkah adalah metode yang digunakan untuk mempelajari siklus hidup bakteriofag dalam infeksi bakteri. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Max Delbrück dan Emory Ellis pada tahun 1939. Studi *one-step growth* mengkaji interval waktu yang dibutuhkan antara adsorpsi dan infeksi partikel bakteriofag tunggal ke dalam sel inang, hingga tercapainya titik awal lisis sel inang (*first burst size*). Periode ini disebut sebagai periode laten. Sedangkan waktu yang diperlukan untuk produksi dan pelepasan partikel bakteriofag dari sel inang disebut periode *burst size* (Li & Zhang, 2014 *as cited in* Aji Handoko, 2021). Kedua periode tersebut dapat diketahui melalui eksperimen kurva *one-step growth* (Kropinski *et al.*, 2018 *as cited in* Aji Handoko, 2021).

4). Karakterisasi Morfologi Bakteriofag Menggunakan *Transmission Electron Microscopy (TEM)*

Karakterisasi bakteriofag (fag) merupakan langkah penting dalam penelitian mikrobiologi, terutama dalam upaya pengendalian patogen. Pemahaman yang mendalam mengenai struktur fag sangat diperlukan untuk mengidentifikasi jenis, karakteristik, serta potensi penggunaannya dalam berbagai aplikasi, termasuk terapi fag. Salah satu metode yang sering digunakan untuk karakterisasi morfologi bakteriofag adalah *Transmission Electron Microscopy (TEM)*. Dengan menggunakan TEM, peneliti dapat memperoleh gambaran yang sangat rinci mengenai struktur dan morfologi fag pada tingkat mikroskopis. Teknik ini memungkinkan analisis detail terhadap komponen-komponen fag, seperti kepala, ekor, dan kapsid (Aprea *et al.*, 2015 *as cited in* Aji Handoko, 2021).

Hal tersebut sangat penting untuk memahami mekanisme infeksi fag serta untuk mengklasifikasikan fag berdasarkan morfologi strukturalnya. Dengan begitu, TEM memainkan peran yang sangat penting dalam penelitian mengenai fag, termasuk dalam klasifikasi taksonomi (Aprea *et al.*, 2015 *as cited in* Aji Handoko, 2021). TEM bekerja dengan menggunakan berkas elektron untuk menghasilkan gambar resolusi tinggi dari sampel yang dianalisis. Proses ini memungkinkan peneliti untuk mengamati struktur yang

sangat kecil, seperti bakteriofag, dengan detail yang sangat rinci. Dalam konteks bakteriofag, sampel biasanya dipersiapkan dengan cara mengaplikasikan larutan fag pada grid karbon yang dilapisi dengan fosfotungstik. Lapisan fosfotungstik ini berfungsi sebagai pewarna negatif, yang meningkatkan kontras gambar yang dihasilkan oleh berkas elektron. Pewarna negatif tersebut membantu membedakan komponen-komponen struktural fag dengan jelas saat berkas elektron melewati sampel. Hal ini memungkinkan analisis detail dari morfologi fag pada tingkat mikroskopis, memberikan informasi yang sangat berguna dalam memahami berbagai aspek dari fag, seperti bentuk dan struktur kapsid, ekor, dan bagian lainnya (Ackermann, H. W. 2012 *as cited in* Aji Handoko, 2021).

5). Pandangan Islam Terhadap Pengobatan Alternatif

Dalam menghadapi kondisi sakit, umat Islam diajarkan untuk bertawakal dan berikhtiar, termasuk dengan mencari pengobatan yang tepat. Allah Swt. telah memerintahkan umat muslim untuk mengonsumsi obat dari bahan yang halal. Dalam Hadist Riwayat Abu Daud, Rasulullah saw. bersabda:

إِنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ الدَّاءَ وَالِدَوَاءَ وَجَعَلَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءً فَتَدَاوَوْا وَلَا تَدَاوَوْا بِحَرَامٍ

Artinya: *“Sesungguhnya Allah telah menurunkan penyakit dan juga obatnya. Dan Allah menjadikan setiap penyakit ada obatnya. Maka berobatlah, tetapi jangan berobat dengan yang haram.”*

Hadis tersebut menjelaskan bahwa segala penyakit terjadi atas kehendak Allah, dan setiap muslim dianjurkan untuk berobat ketika menderita suatu penyakit. Manusia tidak boleh mudah putus asa, karena setiap penyakit pasti ada obatnya. Namun, dalam memilih pengobatan, seorang muslim dianjurkan untuk memilih cara yang baik dan menggunakan obat yang halal (Yana, 2023). Seorang muslim dilarang menggunakan pengobatan atau obat yang diharamkan oleh Allah, meskipun pengobatan tersebut sangat manjur. Penggunaan pengobatan atau obat yang diharamkan hanya diperbolehkan dalam keadaan darurat, apabila tidak ada alternatif lain (Yana, 2023). Pengembangan obat berbasis bakteriofag merupakan alternatif yang menjanjikan untuk menemukan agen antibiofilm yang efektif mengatasi biofilm *Escherichia coli*. Bakteriofag diketahui mengandung enzim-enzim yang dapat melawan bakteri serta mengurai biofilm yang terbentuk.

f. Kajian Penelitian yang Relevan

Tabel 2. 1 Kajian penelitian yang relevan

Penulis	Judul	Metode	Hasil	Research Gap
(Amelia et al., 2023)	<i>Isolation of Escherichia coli Bacteriophages from Domestic Wastewater in Tangerang Selatan</i>	Isolasi bakteriofag litik dari air limbah domestik di Tangerang Selatan. Menggunakan metode <i>plaque assay</i> untuk menentukan aktivitas litik terhadap <i>E. coli</i> .	Bakteriofag litik berhasil diisolasi dari sampel limbah rumah tangga dan memiliki kemampuan melisis sel bakteri yang resisten terhadap beberapa antibiotik, antara lain Amoksisilin, Klindamisin, Siprofloksasin, Azitromisin, dan Trimetoprim/sulfametoksazol Hal ini menunjukkan bahwa bakteriofag memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen terapeutik untuk penyakit infeksi yang disebabkan oleh <i>E. coli</i>	Penelitian ini hanya fokus pada pengujian aktivitas litik bakteriofag terhadap <i>E. coli</i> tanpa mengeksplorasi potensi bakteriofag dalam menghambat atau menghancurkan biofilm yang terbentuk oleh <i>E. coli</i> . Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengkaji kemampuan bakteriofag dalam mengatasi biofilm, yang sering kali mempengaruhi resistensi terhadap antibiotik

Tabel 2. 2 Lanjutan

Penulis	Judul	Metode	Hasil	Research Gap
(Franswi nsly & Savira, 2023)	Isolasi Bakteriofag dari Limbah Cair dengan Aktivitas Litik terhadap <i>Escherichia coli</i>	Penelitian deskriptif laboratorik. Isolasi bakteriofag dilakukan dari limbah cair rumah sakit menggunakan metode <i>spot test</i> dan <i>plaque assay</i> . Konsentrasi bakteriofag dihitung dalam PFU/mL melalui <i>serial dilution</i> .	Bakteriofag litik berhasil diisolasi dari limbah cair rumah sakit dengan konsentrasi $\pm 7,7 \times 10^6$ PFU/mL. Bakteriofag menunjukkan potensi sebagai agen antibakteri terhadap <i>E. coli</i> ATCC 35218 berdasarkan hasil <i>spot test</i> positif.	Penelitian ini hanya fokus pada aktivitas litik bakteriofag terhadap <i>E. coli</i> ATCC 35218, sementara aktivitas antibiofilm dan <i>host range</i> bakteriofag terhadap strain lain belum diuji. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengeksplorasi potensi bakteriofag dalam menghambat biofilm dan menguji kemampuannya terhadap berbagai strain <i>E. coli</i> .

Tabel 2.3 Lanjutan

Penulis	Judul	Metode	Hasil	Research Gap
(Wally <i>et al.</i> , 2021a)	Bakteriofag Spesifik <i>Escherichia coli</i> yang Diisolasi dari Berbagai Sumber Air di Bogor Tengah, Kota Bogor sebagai Antibiotika Alternatif	Isolasi bakteriofag dilakukan dari berbagai sumber air menggunakan metode pengkayaan ganda dan uji plak (<i>plaque assay</i>). Sampel air diuji untuk keberadaan bakteriofag dengan filtrasi dan pengamatan zona lisis pada media agar.	Bakteriofag litik berhasil diisolasi dari air celupan daging Pasar Merdeka dengan konsentrasi 9.1×10^8 PFU/mL. Fag menunjukkan potensi untuk digunakan sebagai terapi alternatif terhadap infeksi bakteri <i>E. coli</i> .	Penelitian ini hanya mengisolasi bakteriofag dari satu sumber (air celupan daging), sehingga belum dapat diketahui potensi bakteriofag terhadap berbagai strain <i>E. coli</i> atau aktivitas antibiofilm yang lebih luas. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menguji <i>host range</i> bakteriofag dan kemampuannya dalam mengatasi biofilm.

Tabel 2. 4 Lanjutan

Penulis	Judul	Metode	Hasil	Research Gap
(Triana, 2018)	Aktivitas Antibiofilm Bakteri <i>Escherichia coli</i> oleh Bakteriofag secara In Vitro	Penelitian menggunakan metode <i>microplate assay</i> untuk menguji aktivitas bakteriofag EC RTH 04 dalam mencegah, menghambat, dan mendegradasi biofilm <i>E. coli</i> . Konsentrasi bakteriofag divariasikan dari 10^2 hingga 10^8 PFU/mL.	Bakteriofag EC RTH 04 efektif dalam mencegah pembentukan biofilm pada konsentrasi 10^6 PFU/mL, menghambat biofilm pada konsentrasi 10^2 PFU/mL, dan mendegradasi biofilm pada konsentrasi 10^2 PFU/mL. Aktivitas degradasi fag lebih tinggi dibandingkan pembersih komersial Biorem.	Penelitian ini belum melakukan identifikasi morfologi bakteriofag menggunakan <i>Transmission Electron Microscopy</i> (TEM), yang penting untuk memahami struktur bakteriofag secara detail dan mengidentifikasi potensi terapeutiknya.

Tabel 2. 5 Lanjutan

Penulis	Judul	Metode	Hasil	Research Gap
Saefunida <i>et al.</i> , 2016	Isolasi Bakteriofag <i>Escherichia coli</i> dari Sistem Distribusi Air Minum Isi Ulang sebagai Antibiofilm	Pengambilan sampel biofilm dari pipa, tangki penyimpanan, dan produk air minum isi ulang. Isolasi bakteriofag menggunakan metode <i>plaque assay</i> . Uji antibiofilm dengan metode <i>microtiter plate assay</i> .	Bakteriofag <i>E. coli</i> berhasil diisolasi dari semua sampel dan menunjukkan aktivitas antibiofilm, dengan efektivitas penghambatan hingga 92,1% dan pelisisan hingga 33,8%	Penelitian ini lebih fokus pada uji antibiofilm dan efektivitas bakteriofag dalam menghambat dan melisiskan biofilm <i>E. coli</i> , tetapi belum menyelidiki aspek-aspek lain dari siklus infeksi bakteriofag tersebut. Kurva <i>one step growth</i> bakteriofag akan memberikan pemahaman lebih mendalam tentang potensi terapeutik bakteriofag sebagai agen antibiofilm

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteriofag *Escherichia coli* ATCC 25922 serta menguji potensinya sebagai agen antibiofilm. Penelitian eksperimen dilakukan dengan mengontrol variabel-variabel yang ada dan memanipulasi objek yang diteliti secara langsung. Data diperoleh melalui percobaan yang dilakukan secara sistematis dan terkontrol di laboratorium untuk memastikan hasil yang valid dan akurat.

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Pendekatan kualitatif dilakukan dengan menguji fag menggunakan metode *Double Layer Agar* (DLA), yang diindikasikan dengan munculnya zona bening (*clear zone*) sebagai tanda bahwa fag dapat melisiskan sel bakteri inang. Morfologi dan ukuran plak yang terbentuk diamati untuk menilai efektivitas fag. Selanjutnya, uji *host range* dilakukan untuk menentukan kisaran inang fag dengan metode *spot test*, yang juga mengandalkan munculnya zona bening sebagai indikasi bahwa fag dapat melisiskan sel bakteri inang yang diuji. Untuk menentukan periode laten dan *burst size*, dilakukan uji *one-step growth* dengan mengamati

peningkatan konsentrasi bakteriofag dalam waktu tertentu, menggunakan uji plaque assay yang melibatkan teknik *double layer agar* (DLA). Selain itu, karakter morfologi bakteriofag juga diuji menggunakan mikroskopi elektron transmisi (TEM), dan diameter kapsid serta panjang ekor bakteriofag diukur menggunakan aplikasi ImageJ.

Pendekatan kuantitatif dilakukan untuk menguji efektivitas bakteriofag terhadap biofilm *E. coli* ATCC 25922 dengan menggunakan metode spektrofotometer. Penurunan nilai *Optical Density* (OD) pada sel bakteri menunjukkan tingkat efektivitas bakteriofag dalam melisiskan biofilm yang terbentuk.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriofag, *Indonesian Culture Collection* (InaCC), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), yang berlokasi di Cibinong, Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Proses penelitian dimulai pada bulan September 2023 dan selesai pada September 2024.

C. Alat dan Bahan

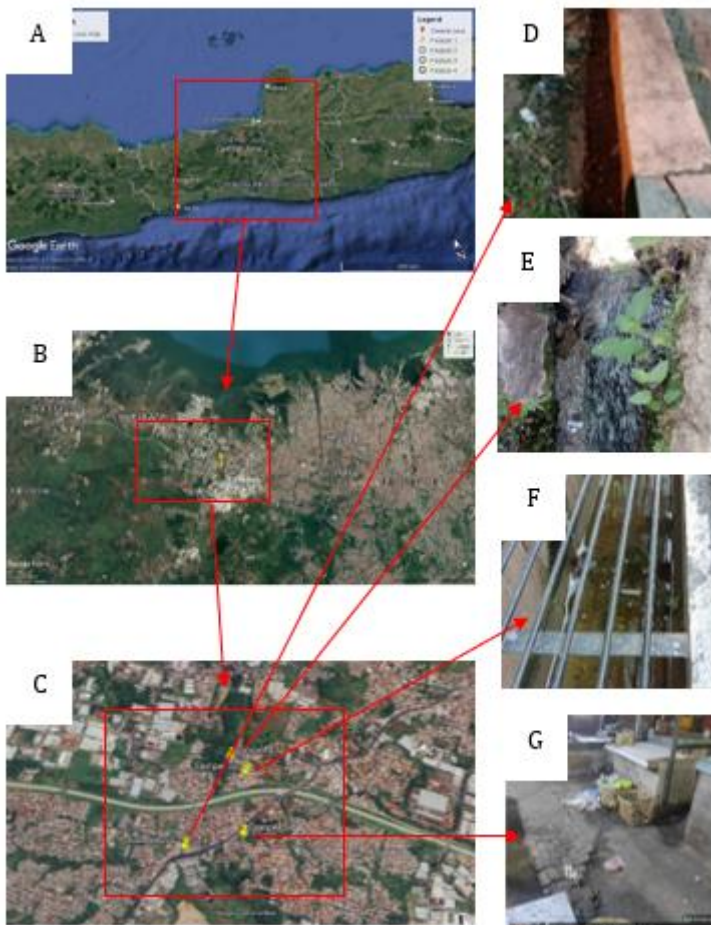
Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, ose, erlenmeyer, gelas *beaker*, *hotplate*, mikroskop elektron, *magnetic stirrer*, neraca analitik, batang pengaduk, gelas ukur, *laminar air flow*, *microtube*, pipet, tip putih, tip kuning, tip biru, *vortex*, *microplate*, *tube* 15 mL, *tube* 50 mL,

aluminium foil, inkubator, *oven*, tabung reaksi, karet, label, jarum suntik, filtrat *micropore* 0,22 μm , autoklaf, shaker, *block heater* (*Stuart SBH200D*), alat tulis, serta komputer dan laptop.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: media 802, CaCl_2 , *buffer fag*, tisu, korek api, solatip bening, kapas, *aquadest*, kultur *E. coli* ATCC 25922, etanol 70%, *E. coli* NBRC 12713, *E. coli* NBRC 13965, *E. coli* NBRC 13168, dan kristal violet 0,1%. Sampel fag berupa air limbah diambil dari beberapa selokan di Kecamatan Ngaliyan, Kota Semarang. Lokasi pengambilan sampel fag dapat tertera pada Tabel 3.1 dan peta 1

Tabel 3. 1 Lokasi pengambilan sampel fag

No.	Kode sampel fag	Asal lokasi sampel	Titik kordinat
1.	SJR	Selokan jalan raya Ngaliyan, Semarang	Lat -6,99867 Long 110,34281
2.	SRM	Selokan rumah makan Tanjung Sari, Ngaliyan, Semarang	Lat -6,99376 Long 110,3464
3.	SL	Selokan laboratorium Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo, Semarang;	Lat -6,9925 Long 110,3456
4.	SPA	Selokan tempat pemotongan ayam di pasar Ngaliyan, Semarang	Lat -6.997792° Long 110.346334°



Gambar 3. 1 Peta lokasi pengambilan sampel bakteriofag. Peta Jawa Tengah (A), Kota Semarang (B), Kecamatan Ngaliyan (C), Selokan jalan raya Ngaliyan, Semarang (D), Selokan rumah makan Tanjung Sari, Ngaliyan, Semarang (E), Selokan Laboratorium Kampus 3 Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang (F), Selokan tempat pemotongan ayam di pasar Ngaliyan, Semarang (G),

D. Metode

1. Preparasi Sampel (Franswinsky & Savira, 2023)

Preparasi sampel limbah cair dilakukan dengan mengikuti protokol yang digunakan oleh (Franswinsky & Savira, 2023). Sebanyak 50 mL limbah cair diambil dari selokan pembuangan limbah dan disimpan dalam botol steril. Limbah cair tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Setelah proses sentrifugasi, supernatan diambil menggunakan *syringe* dan disaring dengan membran filter berukuran 0,22 µm. Sampel yang telah disaring kemudian disimpan pada suhu 4°C.

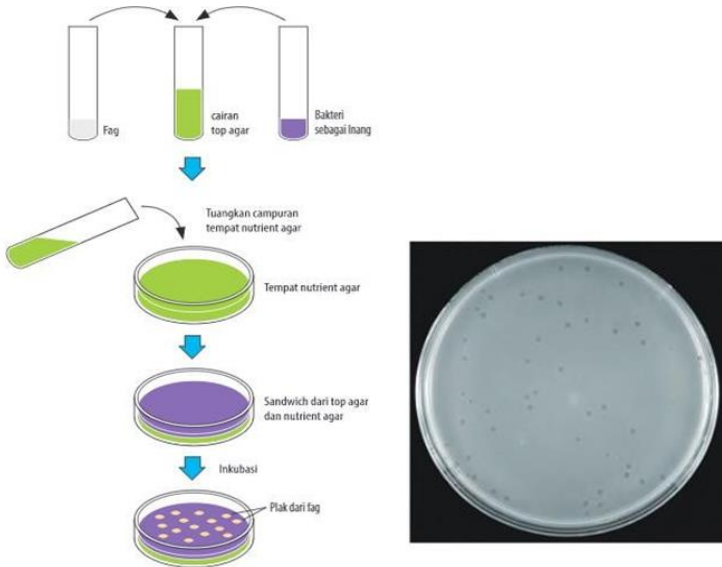
2. Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 (Poxleitner *et al.*, 2018)

Isolasi bakteriofag mengacu pada metode yang dijelaskan oleh Poxleitner *et al.* (2018), yang menggunakan dua teknik, yaitu isolasi langsung dan isolasi diperkaya (*enrichment*). Isolasi langsung dilakukan dengan menggunakan teknik *plaque assay* atau *double layer*. Sebanyak 100 µL sampel yang telah difiltrasi dicampurkan dengan 100 µL kultur cair bakteri *E. coli* ATCC 25922 pada OD₆₀₀ 0,3–1,0. Campuran tersebut kemudian dicampurkan ke dalam 3 mL media semi padat 802 (*yeast extract*, agar 0,6%, CaCl₂, polipeptone, MgSO₄) dan dituangkan di atas media padat 802 (*yeast extract*, agar 2%, polipeptone, MgSO₄). Selanjutnya, media tersebut

diinkubasi selama semalam (16–18 jam) pada suhu 37°C untuk pembentukan plak.

Isolasi diperkaya dilakukan dengan cara 100 µL sampel air yang telah difiltrasi dimasukkan, dicampur dengan 100 µL kultur bakteri cair *E. coli ATCC 25922* pada OD600 0,3–1,0, kemudian diinkubasi selama 15 menit. Campuran ini kemudian dimasukkan ke dalam 3 mL media semi padat 802 (*yeast extract, agar 0,6%, CaCl₂, polypeptone, MgSO₄*) dan dituangkan di atas media padat 802 (*yeast extract, agar 2%, polypeptone, MgSO₄*). Selanjutnya, media tersebut diinkubasi selama semalam (16–18 jam) pada suhu 37°C untuk pembentukan plak.

Plak yang terbentuk dimurnikan dengan cara *pick-up plak, enrichment, serial dilution*, dan *double layer* sebanyak tiga kali. Pada *double layer* ketiga, plak direndam dengan 2 mL *fag buffer* dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah itu, sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Sampel yang telah disentrifugasi kemudian disaring menggunakan membran filter dengan ukuran pori 0,22 µm dan disimpan pada suhu 4°C. *Flowchart* metode *plaque assay/double layer* dapat dilihat pada Gambar 3.2



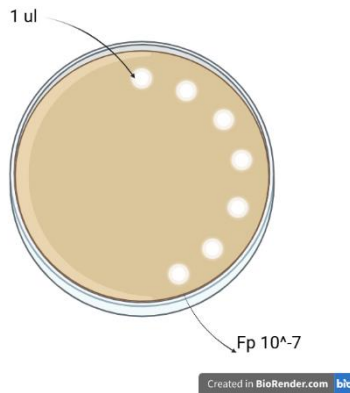
Gambar 3. 2 *Plaque assay/ double layer* (Budiarti & Rusmana, 2018)

3. Propagasi dan Kuantifikasi Bakteriofag (Poxleitner *et al.*, 2018)

a. *Spot Test*

Spot titer bertujuan untuk mengetahui konsentrasi fag dalam lisat dengan menggunakan *small drop/spot test*. Proses *spot titer* dimulai dengan pemberian label pada *agar plate* untuk *spot test*. Label yang harus dicantumkan meliputi nama, tanggal, dan notasi "*spot titer*". Selanjutnya, *overnight host culture* disiapkan untuk digunakan dalam *titer test*. Setelah itu, pengenceran berseri dilakukan pada sampel fag yang akan diuji titer. Lisat pertama kali diencerkan dengan faktor 10^{-1} hingga

10^{-8} menggunakan *phage buffer*. Sebagai kontrol negatif, 3 μL *phage buffer* digunakan. Setelah pengenceran, sebanyak 1 μL dari masing-masing sampel fag yang sudah diencerkan diambil, dan diteteskan pada permukaan *agar plate* yang telah ditumbuhi *host culture*. Setelah proses penetesan, dibiarkan selama 30 menit agar sampel hasil pengenceran dapat meresap ke dalam *agar*. Kemudian, *agar plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah masa inkubasi selesai, jumlah plak yang terbentuk pada *agar plate* dihitung. Contoh perlakuan *spot test* dapat dilihat pada Gambar 3.3



Gambar 3.3 Contoh Perlakuan *Spot Test*
(Dokumen Penelitian, 2024)

Untuk menghitung titer dalam satuan pfu/mL, digunakan rumus berikut:

Contoh perhitungan titer bakteriofag dalam satuan PFU/mL

$$\begin{aligned}
 \text{PFU/ml} &= \frac{1}{\text{FP}} \times \frac{1000}{\text{Vol spot test}} \\
 &= \frac{1}{10^{-7}} \times \frac{1000}{1} \quad \text{PFU/ml} \\
 &= 10^7 \times 1000 \text{ PFU/ml} \\
 &= 10^{10} \times \text{PFU/ml}
 \end{aligned}$$

Setelah proses *spot titer* selesai, langkah selanjutnya adalah melakukan *full plate titer/ Webbed plate*.

b. Pembuatan *Webbed plate* yang diketahui Nilai Titer Bakteriofagnya (Poxleitner *et al.*, 2018)

Pengayaan stok fag dilakukan dengan cara pembuatan *Webbed plate* yang memiliki nilai titer yang diketahui. Tujuan dari pembuatan *Webbed plate* adalah untuk memperoleh isolat fag dengan kepadatan plak yang sangat tinggi dari lisat dengan titer yang telah ditentukan sebelumnya. Langkah pertama dalam prosedur ini adalah persiapan lisat yang diperoleh dari tahap terakhir pemurnian fag. Setelah itu, perhitungan dilakukan untuk menentukan jumlah plak yang diperlukan serta menghitung titer lisat yang dibutuhkan guna menghasilkan *Webbed plate* yang sesuai.

Contoh rumus perhitungan pembuatan *webbed plate* (5000 pfu/*plate*) dengan titer fag yang diketahui 1×10^{10} pfu/ml

$$\begin{aligned}
 &= \frac{5000 \text{ pfu/plate}}{1 \times 10^{10} \text{ pfu/ml}} \\
 &= 5000 \times 10^{-10} \times 1000 \text{ ul/plate} \\
 &= 5 \times 10^3 \times 10^{-9} \times 10^3 \text{ ul/plate} \\
 &= 5 \times 10^{-3} \text{ ul/plate}
 \end{aligned}$$

Setelah perhitungan dilakukan, *plaque assay* dilakukan pada sampel fag. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam tanpa membalik cawan agar agar plak dapat terbentuk dengan baik. Setelah masa inkubasi, apabila *Webbed plate* berhasil terbentuk, langkah berikutnya adalah perendaman *Webbed plate* dengan cairan *buffer fag* steril sebanyak 2-3 mL. Proses ini kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 4°C. Setelah proses inkubasi selesai, cairan *buffer* disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Setelah itu, supernatan yang dihasilkan diambil dan difiltrasi menggunakan *syringe* dan membran filter *millipore* dengan ukuran pori 0,22 μm untuk memperoleh lisat steril. Sebagai langkah terakhir, lisat yang telah difiltrasi diuji kembali menggunakan *spot test* untuk mengetahui titer lisat fag, sebelum disimpan pada suhu 4°C.

4. Uji Kisaran Inang Bakteriofag (Poxleitner *et al.*, 2018)

Uji kisaran inang dilakukan dengan menggunakan metode *spot test*, yang mengacu pada prosedur yang dijelaskan oleh Narulita *et al.* (2018). Dalam uji ini, bakteri *E. coli* yang digunakan adalah turunan strain *E. coli* dari NBRC 12713, NBRC 13965 dan NBRC 13168. Sebanyak 100 μL bakteri dicampurkan ke dalam 3 mL media semi solid 802, kemudian dicampurkan dengan media solid 802. Setelah itu, stok bakteriofag sebanyak 1-2 μL diteteskan pada permukaan media solid 802 yang telah mengeras. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam (*overnight*). Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan untuk mengidentifikasi perkembangan plak pada media. Plak yang terbentuk kemudian diklasifikasikan berdasarkan tingkat kecerahannya menjadi dua kelas: (+) menunjukkan bakteri yang rentan terhadap bakteriofag, dan (-) menunjukkan bakteri yang resisten terhadap bakteriofag.

5. Uji Antibiofilm (Haney *et al.*, 2021)

a. Uji Pembentukan Biofilm

Sebanyak 100 μL suspensi bakteri dengan nilai optical density (OD) 0,1 pada panjang gelombang 600 nm dimasukkan ke dalam setiap sumur uji pada *microplate* 96-well steril. Sebagai kontrol negatif, 100 μL media 802 digunakan pada sumur kontrol. Setelah itu, *microplate* yang berisi suspensi

bakteri patogen diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam inkubasi, suspensi bakteri patogen pada *microplate* dibuang. Selanjutnya, *microplate* dibilas dengan *aquadest* steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan cara membalikkan *microplate* di atas tisu kering.

Pewarnaan biofilm dilakukan dengan menambahkan 105 μL larutan kristal violet 0,1% ke masing-masing sumur pada *microplate*. Kemudian, *microplate* diinkubasi pada *incubator shaker* dengan suhu ruang selama 30 menit. Setelah proses inkubasi selesai, *microplate* yang berisi larutan kristal violet dicuci dengan *aquadest* steril dan dikeringkan. Langkah terakhir adalah menambahkan 110 μL larutan etanol 70% ke dalam masing-masing sumur dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang. Nilai OD diukur untuk menentukan tingkat kekeruhan pelarut menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Pada penelitian ini, panjang gelombang yang digunakan adalah 595 nm karena mengacu pada penelitian sebelumnya yakni Fadhila & Sari (2019) yang melakukan optimasi panjang gelombang dengan tiga variasi, yaitu 490 nm, 595 nm, dan 655 nm. Hasil optimasi menunjukkan bahwa panjang gelombang 595 nm adalah yang paling optimal untuk membaca biofilm.

Nilai OD yang diperoleh selanjutnya dihitung untuk menentukan nilai OD *c* (*cut-off value*) dan OD isolat.

Perhitungan ini bertujuan untuk mengklasifikasikan apakah isolat bakteri patogen dapat menghasilkan biofilm atau tidak, dengan menggunakan rumus perhitungan sebagai berikut:

OD c = rata-rata kontrol negatif + (*Triplicate* x standar deviasi dari kontrol negatif).

OD isolat = rata-rata OD isolat – OD c.

Selanjutnya, nilai yang diperoleh diinterpretasikan berdasarkan **Tabel 3. 2**. Jika nilai OD isolat lebih tinggi dibandingkan dengan nilai OD kontrol negatif, maka bakteri patogen tersebut dinyatakan positif membentuk biofilm

Tabel 3. 2 Kategori pembentukan biofilm

No	Nilai OD bakteri	Kategori
1.	OD bakteri \leq OD <i>cut-off</i>	Bukan pembentuk biofilm.
2.	OD <i>cut-off</i> < OD bakteri \leq 2 x OD <i>cut-off</i> =	Pembentuk biofilm lemah.
3.	2 x OD <i>cut-off</i> < OD bakteri \leq 4 x OD <i>cut-off</i>	Pembentuk biofilm sedang.
4.	OD bakteri > 4 x OD <i>cut-off</i>	Pembentuk biofilm kuat.

b. Uji Inhibisi Pembentukan Biofilm (Haney et al., 2021)

Metode *microtiter plate assay* (MtP) digunakan untuk mengukur tingkat penghambatan pembentukan biofilm. Sebanyak 90 μL suspensi bakteri patogen dengan nilai *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm sebesar 0,1 diinokulasi ke dalam sumur uji pada *microplate* 96 well steril. Kemudian, 10 μL supernatan fag (lisat) ditambahkan. Sebagai kontrol negatif, digunakan 90 μL suspensi bakteri patogen dan 10 μL *buffer* fag, sedangkan kontrol positif menggunakan 100 μL media 802. Setelah itu, *microplate* 96 well yang berisi suspensi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, suspensi bakteri pada *microplate* dibuang, lalu *microplate* dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan membaliknyanya di atas tisu kering.

Pewarnaan biofilm dilakukan dengan menambahkan 105 μL larutan kristal violet 0,1% ke masing-masing sumur dan menginkubasi *microplate* di *incubator shaker* pada suhu ruang selama 30 menit. Larutan kristal violet kemudian dibuang, dan *microplate* dicuci dengan *aquades* sebelum dikeringkan dengan cara membalikkannya di atas tisu kering. Selanjutnya, sebanyak 110 μL etanol 70% ditambahkan ke dalam masing-masing sumur dan didiamkan selama 30 menit untuk melarutkan biofilm yang telah diwarnai. Nilai OD diukur menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Nilai OD yang diperoleh kemudian dihitung untuk menentukan persentase penghambatan dengan menggunakan rumus:

Rumus perhitungan presentase penghambatan biofilm

$$\% \text{ penghambatan (inhibisi)} = \frac{(K(+)) - K(-) - (\text{rata-rata sampel} - K(-))}{(K(+)) - (K(-))} \times 100\%$$

Kontrol (-) = rata-rata nilai OD pengulangan sumur bakteri patogen

Kontrol (+) = rata-rata nilai OD pengulangan sumur media

Rata-rata sampel = rata-rata nilai OD pengulangan sampel fag dalam menghambat biofilm bakteri patogen

c. Uji Eradikasi Biofilm

Metode *microtiter plate assay* (MtP) digunakan untuk mengukur tingkat penghancuran biofilm. Sebanyak 100 μL suspensi bakteri patogen dengan nilai *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm sebesar 0,1 diinokulasi ke dalam sumur uji pada *microplate* 96 well steril. Sebagai kontrol negatif, digunakan 90 μL suspensi bakteri patogen dan 10 μL buffer fag, sementara kontrol positif menggunakan 100 μL bakteri *E. coli*.

Microplate 96 well yang telah berisi inang dan kontrol negatif diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Setelah masa inkubasi, suspensi bakteri pada *microplate* dibuang, kemudian *microplate* dibilas dengan aquades steril sebanyak satu kali dan

dikeringkan dengan cara membalikinya di atas tisu kering di dalam *laminar air flow*. Selanjutnya, 100 μL lisat fag dimasukkan ke dalam sumur uji pada *microplate* 96 well dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, suspensi fag pada *microplate* dibuang, dan *microplate* dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali.

Pewarnaan biofilm dilakukan dengan menambahkan 105 μL larutan kristal violet 0,1% ke dalam masing-masing sumur, lalu *microplate* diinkubasi dalam *incubator shaker* pada suhu ruang selama 30 menit. Larutan kristal violet dibuang, dan *microplate* dicuci dengan aquades sebelum dikeringkan dengan cara membalikkan *microplate* di atas tisu kering. Selanjutnya, 110 μL etanol 70% ditambahkan ke dalam masing-masing sumur dan didiamkan selama 30 menit untuk melarutkan biofilm yang telah diwarnai dengan larutan kristal violet. Nilai OD diukur menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Nilai OD yang diperoleh kemudian dihitung untuk menentukan persentase eradikasi dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

Rumus perhitungan presentase penghancuran biofilm adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ penghancuran (eradikasi)} = \frac{(K(+)-K(-))-(\text{rata-rata sampel}-K(-))}{(K(+))-(K(-))} \times 100\%$$

Kontrol (-) = rata-rata nilai OD pengulangan sumur bakteri patogen

Kontrol (+) = rata-rata nilai OD pengulangan sumur media

Rata-rata sampel = rata-rata nilai OD pengulangan sampel fag dalam menghambat biofilm bakteri patogen

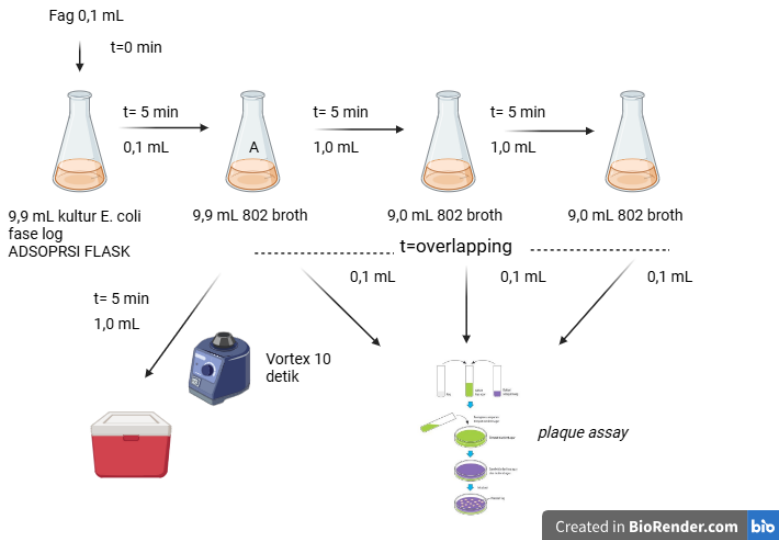
6. Uji *One step growth* Bakteriofag (Kropinski, 2018)

One step growth dilakukan berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Kropinski (2018), dengan beberapa modifikasi, yang bertujuan untuk menentukan periode laten dan *burst size*. Periode laten ditandai dengan peningkatan konsentrasi bakteriofag, sementara *burst size* dihitung sebagai perbandingan antara jumlah akhir partikel bakteriofag dengan jumlah sel bakteri yang terinfeksi selama periode laten (Adam, 1959). Sebanyak 0,1 mL lisat fag ditambahkan ke dalam kultur bakteri sebanyak 9,9 mL, kemudian 100 μL CaCl_2 ditambahkan untuk langkah adsorpsi. Campuran ini diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.

Setelah inkubasi, 0,1 mL dari *adsorption flask* dipindahkan ke dalam 9,9 mL medium 802 cair pada *Erlenmeyer A*. Campuran ini kemudian divorteks selama 10

detik untuk homogenisasi. Selanjutnya, sebanyak 1,0 mL dari *Erlenmeyer A* dipindahkan ke dalam *microtube* steril dan divorteks selama 10 detik. Tabung tersebut disimpan di atas es sebagai kontrol adsorpsi. Proses dilanjutkan dengan memindahkan 1,0 mL dari *Erlenmeyer A* ke dalam 9,0 mL medium 802 pada *Erlenmeyer B*, kemudian divorteks selama 10 detik. Selanjutnya, sebanyak 1,0 mL dari *Erlenmeyer B* dipindahkan ke dalam 9,0 mL medium 802 pada *Erlenmeyer C*.

Selanjutnya, sebanyak 1,0 mL dari erlenmeyer A dipindahkan ke dalam 9,0 mL medium 802 pada erlenmeyer B, kemudian di vorteks selama 10 detik. Proses dilanjutkan dengan memindahkan 1,0 mL dari erlenmeyer B ke dalam 9,0 mL medium 802 pada erlemeyer C. Pada waktu yang berbeda, 0,1 mL dari *Erlenmeyer* (A, B, atau C) diambil dan ditambahkan ke dalam 3 mL overlay agar pada *vial*, kemudian 1-3 tetes kultur inang *overnight* ditambahkan. Campuran ini kemudian divorteks dan dituang ke atas media solid 802. Setelah *overlay* agar mengeras selama sekitar 15 menit, *plate* dibalik dan diletakkan dalam inkubator untuk diinkubasi selama *overnight*. Setelah jumlah plak yang terbentuk dihitung. Eksperimen kurva *one-step growth* dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. *Flowchart* uji *one step grwoth* dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3. 4 Metode *One Step Growth* (OSG) *experiment* (Kropinski, 2018)

7. Karakterisasi Morfologi Bakteriofag Menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (phagesdb.org)

Sebanyak 10 μL stok fag ditetaskan pada grid (400 mesh) menggunakan mikropipet dan dibiarkan selama 30 detik. Setelah itu, grid dikeringkan dengan kertas saring. Kemudian, sebanyak 5 μL uranyl asetat 2% ditetaskan ke atas grid dan dibiarkan selama 1 menit. Uranyl asetat 2% berfungsi sebagai cairan fiksasi yang juga menonaktifkan fag. Setelah proses fiksasi, grid dikeringkan lagi dengan menggunakan kertas saring dan dibiarkan selama sekitar 60 menit agar benar-benar

kering. Setelah grid kering, grid diletakkan pada holder mikroskop elektron. Fag kemudian diamati menggunakan mikroskop elektron transmisi model JEOL JEM-1010 yang dioperasikan pada tegangan 80 kV dengan perbesaran 10.000x.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922

1. Isolasi Bakteriofag Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922

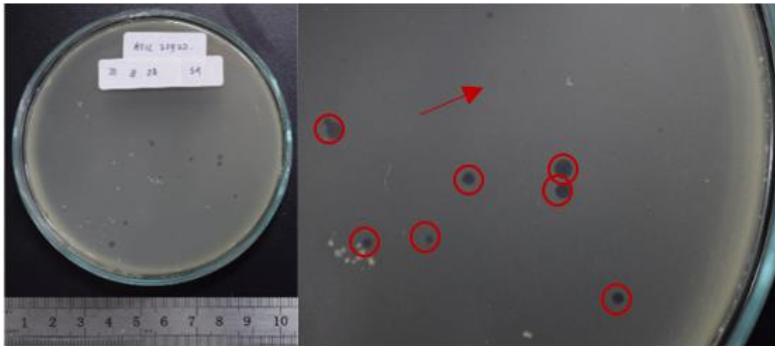
Isolasi bakteriofag spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan pada empat sampel uji berupa air limbah yang diambil dari lokasi berbeda di Ngaliyan, Semarang yang ditunjukkan pada Tabel 3.1 Pemilihan lokasi pengambilan sampel ini menyesuaikan habitat bakteri *E. coli* sebagai inang fag, karena bakteriofag ada di mana bakteri inang berada (Budiarti & Rusmana, 2018). *E. coli* secara alami ditemukan di dalam saluran pencernaan hewan, termasuk manusia. Oleh karena itu, lokasi yang berhubungan dengan lingkungan tersebut, seperti selokan tempat pemotongan ayam pasar Ngaliyan, Semarang, menjadi pilihan untuk isolasi bakteriofag. Kemudian, *E. coli* dikenal juga sebagai bakteri kosmopolit, yang berarti ia dapat ditemukan di berbagai lingkungan, tidak hanya terbatas pada saluran pencernaan. Hal tersebut menunjukkan bahwa *E. coli* dapat bertahan di berbagai habitat, termasuk lingkungan yang mungkin terkontaminasi feces hewan, seperti selokan jalan raya Ngaliyan, Semarang; selokan rumah makan Tanjung Sari, Ngaliyan, Semarang; dan selokan laboratorium

FST kampus 3 UIN Walisongo Semarang. Metode preparasi sampel limbah cair mengikuti prosedur yang dilakukan oleh (Franswinsky & Savira, 2023).

Dalam penelitian ini digunakan dua metode isolasi bakteriofag, yaitu *direct isolation* dan *enrichment isolation*. *Direct isolation* digunakan untuk isolasi cepat bakteriofag dari sampel air limbah, yang memungkinkan untuk mendapat hasil dalam waktu singkat. Sedangkan *enrichment isolation* dipakai sebagai langkah lanjutan jika hasil dari metode *direct isolation* tidak menghasilkan bakteriofag yang diinginkan. Metode *enrichment isolation* bertujuan untuk meningkatkan jumlah bakteriofag dari alam. Deteksi adanya fag dari sampel dilakukan dengan metode *double layer*. Adanya plak pada hasil uji *double layer* menunjukkan bahwa sampel positif mengandung bakteriofag yang mampu melisiskan bakteri inang. Pada penelitian ini, inang yang digunakan adalah bakteri *E. coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari InaCC (*Indonesian Culture Collection*) BRIN Cibinong, Bogor.

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode *direct isolation* berhasil mengisolasi bakteriofag dari sampel SPA yang ditandai dengan terbentuknya *clear zone*/plak pada *bacterial lawn* di cawan agar yang dapat dilihat pada Gambar 4.1. Sebaliknya, pada sampel SJR, SRM, dan SL tidak

ditemukan tanda-tanda keberadaan bakteriofag, yang ditunjukkan dengan tidak adanya plak pada *bacterial lawn*.

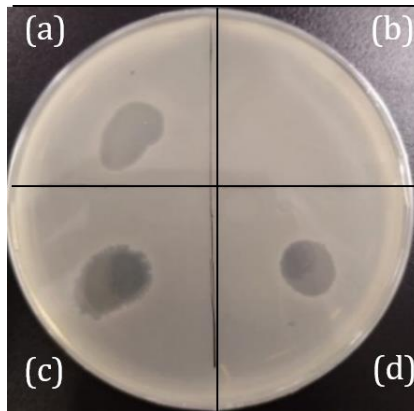


Gambar 4. 1 Morfologi plak bakteriofag dari sampel fag S4 hasil isolasi langsung (Dokumentasi Penelitian, 2024)

Keterangan

- = *Plaque* sebagai bakteriofag yang melisis *E. coli* ATCC 25922
- ➔ = *Bacterial lawn* / zona pertumbuhan *E. coli* ATCC 25922

Berdasarkan hasil pengamatan, plak fag yang terbentuk dari sampel fag SPA hasil direct isolation yang ditandai dengan lingkaran merah pada Gambar 4.1 memiliki diameter yang bervariasi berkisar 0,9 hingga 2 mm. Semua plak yang terbentuk menunjukkan tingkat transparansi yang seragam, yakni bening (*clear*), tanpa adanya halozone di sekitarnya.



Gambar 4. 2 Hasil uji *spot test/small drop* dari sampel fag SJR (a) SRM (b), SL(c) dan SPA (d) (Dokumentasi Penelitian, 2024)

Berdasarkan Gambar 4.2, diketahui bahwa plak bakteriofag dari sampel SJR, SL, dan SPA hasil *enrichment isolation* memiliki diameter ukuran yang bervariasi dan tingkat transparansi plak juga menunjukkan variasi; beberapa plak tampak bening (*clear*), sementara yang lainnya sedikit keruh (*turbid*). Bentuk tepian plak pun berbeda-beda; ada yang membentuk cincin atau halo, sementara yang lainnya tidak. Mekanisme pembentukan plak dimulai dengan infeksi oleh sebuah fag yang melisis sel bakteri inang. Setelah proses lisis, fag-fag baru dilepaskan dari sel yang telah terinfeksi. Fag-fag ini kemudian menginfeksi sel-sel bakteri inang di sekitarnya, dan siklus ini berulang. Akibatnya, sel-sel bakteri

inang di sekitar partikel fag awal terus mengalami lisis dan siklus ini berhenti hingga inang mencapai fase kematian dan terbentuklah plak (Deshanda *et al.*, 2019).

Berdasarkan hasil isolasi langsung (*direct isolation*) yang ditunjukkan pada Gambar 4.1, hanya sampel uji SPA yang terbukti mengandung bakteriofag, sementara sampel lainnya (SJR, SL, SRM) tidak menunjukkan keberadaan fag. Namun, setelah dilakukan isolasi menggunakan metode *enrichment* yang ditunjukkan pada Gambar 4.2, selain sampel uji SPA, sampel uji SJR dan SL juga terkonfirmasi mengandung bakteriofag. Adanya perbedaan hasil antara metode *direct* dan *enrichment* kemungkinan disebabkan oleh keterbatasan pada metode *direct* serta sedikitnya jumlah bakteriofag yang terdapat dalam sumber sampel.

Menurut Poxleitner *et al.* (2018), kelemahan metode *direct isolation* adalah tidak semua bakteriofag yang ada di lingkungan dapat menginfeksi bakteri inang melalui proses ini. Budiarti & Rusmana (2018) menambahkan bahwa jumlah bakteriofag yang dapat diisolasi langsung dari alam sering kali sangat sedikit. Berdasarkan penjelasan tersebut, kemungkinan gagalnya hasil *direct isolation* dalam mendeteksi fag pada sampel uji SJR, SRM, dan SL disebabkan oleh sedikitnya jumlah bakteriofag dalam sampel, sehingga fag yang

sedikit tersebut tidak dapat menginfeksi bakteri melalui metode direct.

Kegagalan identifikasi fag pada uji *direct isolation* diatasi dengan menggunakan uji *enrichment*. Dalam uji *enrichment*, sampel yang diyakini mengandung bakteriofag terlebih dahulu ditumbuhkan bersama bakteri inang untuk memperbanyak fag secara langsung. Setelah itu, sampel hasil *enrichment* dilanjutkan ke dalam uji plak untuk mengonfirmasi keberadaan bakteriofag yang dilihat dalam bentuk plak. Hasil dari uji *enrichment isolation* dalam penelitian ini berhasil membuktikan adanya bakteriofag pada sampel uji SJR dan SL, yang sebelumnya tidak terdeteksi dalam uji *direct isolation*.

Pada sampel uji SRM, baik melalui uji *direct isolation* maupun *enrichment isolation*, tidak terdeteksi keberadaan bakteriofag. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh tidak adanya bakteriofag yang secara spesifik menginfeksi bakteri *E. coli* dalam sampel tersebut. Namun, beberapa faktor lain dapat menyebabkan kegagalan pembentukan plak dari sampel SRM, seperti adanya kontaminasi zat pada sumber sampel yang dapat merusak struktur bakteriofag seperti pemutih dan deterjen. Pemutih (hipoklorit) merupakan bahan kimia yang dapat menginaktivasi bakteriofag dengan efektif. Selain itu, sabun atau deterjen yang mengandung peroxygen

juga dapat merusak dan melarutkan struktur membran lipid yang menjadi selubung bakteriofag (Prayitno *et al.*, 2021).

Hasil isolasi bakteriofag pada penelitian ini, sejalan dengan penelitian sebelumnya. Seperti hasil penelitian Lingga *et. al* (2023) Oyang berhasil memperoleh lima bakteriofag spesifik *E. coli* patogen dari air limbah cair rumah sakit yang semuanya memiliki plak bening. Selanjutnya, hasil penelitian Bobby Franswally *et al.* (2023) berhasil mengisolasi bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 35218 dari limbah cair instalasi pengolahan limbah rumah sakit yang memiliki plak bening. Selain itu, hasil penelitian Novianty and Budiarti, (2014) menemukan bakteriofag spesifik *Photobacterium damsela* dari sampel air Sungai Ciparigi, Bogor dengan dua jenis plak yakni bening dan keruh. Plak bening dihasilkan oleh isolat F A91 dan plak keruh dihasilkan oleh isolat F A92.

Setelah proses isolasi selesai dan plak bakteriofag berhasil diperoleh, langkah selanjutnya adalah karakterisasi plak yang meliputi pengamatan terhadap ukuran, tepian, dan tingkat opalesensi. Namun, pada penelitian ini, proses karakterisasi plak tidak dilakukan pada seluruh plak bakteriofag yang dihasilkan dari proses isolasi baik *direct* maupun *enrichment*. Hanya beberapa plak yang mewakili karakteristik pada masing-masing sampel fag yang dipilih untuk dikarakterisasi. Berdasarkan perbedaan karakteristik

plak yang terbentuk, sebanyak 16 plak isolat bakteriofag dipilih untuk dikarakterisasi. Karakteristik morfologi dari 16 plak tersebut dapat dilihat pada Lampiran Tabel 1.1 dan 1.2.

Berdasarkan Lampiran Tabel 1.1 dan 1.2 diketahui bahwa plak bakteriofag dari hasil isolasi, baik melalui *direct isolation*, maupun *enrichment isolation*, dapat diamati bahwa 16 plak bakteriofag menunjukkan variasi dalam hal ukuran, tingkat transparansi, dan bentuk tepian. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah konsentrasi *overlay agar* yang digunakan, jenis bakteriofag yang menginfeksi, enzim yang diproduksi bakteriofag, suhu inkubasi, jumlah populasi bakteri, durasi inkubasi, penambahan CaCl_2 , waktu lisis fag dan jumlah progeni (Budiarti & Rusmana, 2018).

Konsentrasi *soft agar* berpengaruh terhadap proses difusi fag dalam media sehingga mempengaruhi pembentukan plak. *Soft agar* ini memfasilitasi bakteriofag untuk membentuk plak. Konsentrasi *Soft agar* yang lebih rendah dapat menghasilkan plak dengan ukuran besar Namun apabila konsentrasi *soft agar* terlalu rendah, *soft agar* akan sulit mengeras meskipun sudah dingin dan hal tersebut dapat mengganggu kestabilan struktur *soft agar* selama penelitian dan bisa merusak plak yang sudah terbentuk. Dalam penelitian ini, digunakan *soft agar* dengan konsentrasi 0,8%, merujuk

pada Budiarti & Rusmana (2018), yang menyatakan bahwa konsentrasi 0,8% tidak hanya lebih mudah membeku tetapi juga memungkinkan bakteriofag untuk berdifusi dengan baik dalam media agar.

Selanjutnya, faktor lain yang mempengaruhi pembentukan plak adalah jenis bakteriofag. Deshanda *et al.* (2019) menyebutkan bahwa jenis fag yang berbeda akan menghasilkan plak dengan ukuran dan bentuk tepian yang bervariasi. Dari segi ukuran, semakin besar ukuran bakteriofag, semakin kecil diameter plak yang terbentuk (Lingga *et al.*, 2020). Selain mempengaruhi ukuran, jenis fag yang berbeda juga dapat menghasilkan bentuk plak yang berbeda. Plak yang jernih, menandakan bahwa bakteriofag tersebut bersifat virulen dan menjalani siklus hidup litik. Bakteriofag litik sangat efektif untuk mengendalikan kontaminasi bakteri karena dapat langsung membunuh inangnya tanpa kemungkinan membentuk lisogen pada populasi sel yang terinfeksi (Fernández *et al.*, 2019) Sebaliknya, plak yang keruh dengan halo biasanya berasal dari bakteriofag litik yang kemudian memasuki fase lisogenik akibat pengaruh stres lingkungan (Budiarti and Rusmana, 2018).

Kemudian, faktor enzim yang diproduksi oleh bakteriofag dapat membentuk tepian plak yang berbeda.

Tepian plak yang memiliki halo kemungkinan disebabkan oleh enzim yang dikeluarkan oleh bakteriofag (Deshanda *et al.* 2019). Hans (2022) menambahkan bahwa halo pada plak tidak disebabkan oleh infeksi partikel fag langsung. Pembentukan halo ini murni dipicu oleh aktivitas enzimatik. Protein (enzim) seperti endolisin dan depolimerase dilepaskan dari zona pembersihan yang diinduksi oleh bakteriofag. Kehadiran halo menunjukkan bahwa bakteriofag dapat melewati penghalang berbasis polisakarida, seperti biofilm (Pratiwi, 2021). Dibandingkan dengan partikel fag, enzim ini jauh lebih kecil, sehingga dapat berdifusi lebih jauh ke area *bacterial lawn* (Hans, 2022). Umur kultur bakteri inang juga berperan penting dalam pembentukan plak. Budiarti (2018) menyebutkan bahwa fase pertumbuhan bakteri yang paling optimal untuk menghasilkan plak dengan ukuran yang lebih besar adalah saat sel bakteri masih aktif membelah, yaitu pada fase log/eksponensial. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, digunakan kultur bakteri *E. coli* yang diinkubasi semalaman, kemudian dilakukan peremajaan selama 3 jam, sehingga konsentrasinya mencapai $6,77 \times 10^9$ CFU/mL.

Selain itu, lamanya waktu inkubasi juga berpengaruh terhadap ukuran plak. Budiarti (2018) menyebutkan bahwa beberapa jenis bakteriofag enterobacter yang diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi anaerob, diikuti dengan 16 jam

inkubasi dalam kondisi aerob, dapat menghasilkan plak yang 2-8 kali lebih besar. Dalam penelitian ini, digunakan waktu inkubasi selama 18 jam, yang mungkin menjadi faktor penyebab ukuran plak dari hasil isolasi yang relatif kecil.

Penambahan CaCl_2 pada media agar dapat meningkatkan ukuran dan jumlah plak yang dihasilkan oleh bakteriofag. CaCl_2 membantu proses adsorpsi bakteriofag ke reseptor bakteri, sehingga memfasilitasi infeksi dan pembentukan plak yang lebih besar dan jelas (Budiarti & Rusmana, 2018). Selain faktor-faktor yang telah disebutkan di atas, terdapat beberapa faktor lain yang mempengaruhi ragam karakter bakteriofag, salah satunya adalah waktu lisis bakteriofag. Waktu lisis yang singkat dan jumlah progeni yang lebih sedikit akan menghasilkan ukuran plak yang lebih kecil begitu pun sebaliknya (Gallet *et al.*, 2011).

2. Purifikasi Bakteriofag

Purifikasi dilakukan terhadap 16 isolat bakteriofag yang telah melalui proses karakterisasi plak, yang dapat dilihat pada Lampiran Tabel 1.1. Proses purifikasi mengacu pada metode Poxleitner *et al.*, (2018) yang melibatkan beberapa langkah, termasuk *pick up a plaque*, pengenceran berseri, dan *double layer*. Langkah-langkah ini diulang sebanyak tiga kali yang mengacu pada teknik mikrobiologi klasik. Fag yang sudah

murni ditandai dengan morfologi plak yang relatif seragam. Hasil purifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4. 1 16 Karakter plak bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922 setelah purifikasi tahap ke 3

No	Kode Isolat Fag	Karakteristik plak fag		
		Ukuran diameter plak (mm)	<i>Halozone</i>	Opalesensi
1	S1	1	Tidak ada	<i>Turbid</i>
2	S2	1	Ada	<i>Clear</i>
3	S3	3	Ada	<i>Turbid</i>
4	S4	4	Ada	<i>Clear</i>
5	S5	2	Tidak ada	<i>Turbid</i>
6	S6	2	Tidak ada	<i>Clear</i>
8	S8	2	Ada	<i>Clear</i>
9	S9	1	Ada	<i>Turbid</i>
10	S10	2	Ada	<i>Clear</i>
11	S11	3	Ada	<i>Clear</i>
12	S12	2	Ada	<i>Clear</i>
13	S13	2	Tidak ada	<i>Clear</i>
14	S14	3	Tidak ada	<i>Clear</i>
15	S15	3	Tidak ada	<i>Clear</i>
16	S16	3	Tidak ada	<i>Clear</i>

Berdasarkan hasil purifikasi yang tercantum dalam Tabel 4.1, terdapat perbedaan ukuran plak. Perbedaan ukuran ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti waktu inkubasi, suhu, dan konsentrasi *overlay agar* (Budiarti & Rusmana, 2018). Dalam proses pemurnian, ukuran plak bukanlah karakteristik morfologi yang paling diperhatikan karena satu jenis fag seringkali dapat memiliki ukuran plak yang bervariasi.

Sebaliknya, ada atau tidak adanya halo (lingkaran cahaya) serta tingkat kekeruhan pada plak lebih dapat dijadikan acuan utama untuk menentukan morfologi plak (Poxleitner *et al.*, 2018).

Setelah tahap purifikasi tahap ketiga selesai dan diperoleh sampel dengan morfologi plak yang relatif seragam, fag dikumpulkan dengan cara membanjiri plak menggunakan SM buffer. SM buffer (Saline Magnesium Buffer) dapat mempertahankan viabilitas bakteriofag selama penyimpanan. Setelah plak dibanjiri dengan SM buffer, selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama semalaman untuk memungkinkan fag berdifusi ke dalam SM buffer. Setelah itu, filtrasi dilakukan menggunakan membran Milipore 0,22 µm untuk memisahkan pengotor, termasuk bakteri, dari SM buffer yang mengandung fag. SM Buffer yang mengandung fag disebut lisat atau cairan yang mengandung bakteriofag. Setelah proses filtrasi, lisat disimpan pada suhu 4°C (Poxleitner *et al.*, 2018). Pada tahap ini, proses purifikasi dinyatakan selesai.

Setelah tahap purifikasi selesai dan diperoleh lisat bakteriofag, proses selanjutnya adalah propagasi lisat bakteriofag, karena jumlah lisat hasil purifikasi putaran ketiga tidak mencukupi untuk kebutuhan uji lanjutan. Proses propagasi lisat bakteriofag juga bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi fag. Langkah awal propagasi adalah dengan

membuat *Webbed plate*. *Webbed plate* adalah *plate* dengan jumlah plak yang sangat padat sehingga hanya menyisakan jaring-jaring bakteri yang tertinggal diantara plak, mirip seperti jaring laba-laba. *Webbed plate* ini adalah bahan dasar dari pembuatan lisat dengan nilai titer tinggi yang digunakan untuk pengujian lanjutan.

Dalam penelitian ini, fag dipropagasi hingga mencapai titer 5×10^3 PFU/mL. Jumlah ini mengacu pada ketentuan batas minimal kuantifikasi/*Lower Limit of Quantification* (LLOQ) untuk titer fag ditetapkan 5.000 PFU/mL, dibawah itu fag tidak dianggap memadai untuk analisis lebih lanjut; seperti *TEM* maupun uji antibiofilm (Tan *et al.*, 2024). Titer fag di atas 5,000 PFU/mL dianggap penting untuk mendapatkan data yang valid dalam konteks farmakokinetik fag (Tan *et al.*, 2024).

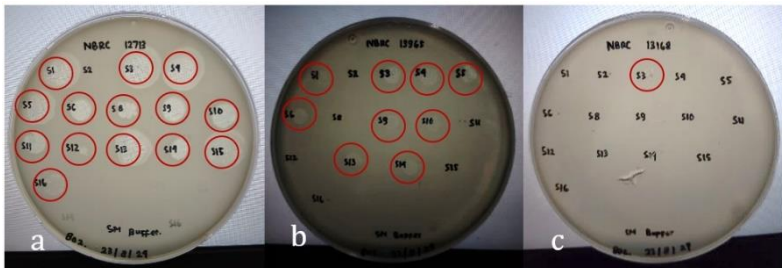
Setelah lisat berhasil dibuat dan dipropagasi, lisat disimpan pada suhu 4°C untuk menjaga stabilitasnya. Suhu 4°C dipilih karena, berdasarkan hasil penelitian (Jończyk *et al.*, 2011) suhu rendah (4°C)-(-80°C) lebih efektif untuk mempertahankan stabilitas bakteriofag dalam jangka panjang.

B. Uji Kisaran Inang Bakteriofag Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922

Uji kisaran inang bertujuan untuk mengetahui tingkat spesifitas dan kisaran inang fag luas atau sempit (Budiarti & Rusmana, 2018). Uji kisaran inang pada penelitian ini dilakukan dengan cara menginfeksi fag spesifik *E. coli* ATCC 25922 pada bakteri lain, yakni *E. coli* NBRC 12713, *E. coli* NBRC 13965, dan *E. coli* NBRC 13168. Metode yang dipakai adalah metode *double layer* dengan kombinasi *spot test*. Hasil uji *host range* dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.2.

Tabel 4. 2 Hasil uji kisaran inang *E. coli* ATCC 25922

Kode Isolat	Bakteri Inang		
	NBRC 12713	NBRC 13965	NBRC 13168
S1	+	+	-
S3	+	+	+
S4	+	+	-
S5	+	+	-
S6	+	+	-
S8	+	-	-
S9	+	+	-
S10	+	+	-
S11	+	-	-
S12	+	-	-
S13	+	+	-
S14	+	+	-
S15	+	-	-
S16	+	-	-



Gambar 4. 3 Hasil uji kisaran inang bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922 terhadap NBRC 12713, NBRC 13965, NBRC 13168

Keterangan:

○ = clear zone/zona lisis bakteri

Berdasarkan Tabel 4.2 dan Gambar 4.3 menunjukkan bahwa semua sampel fag (S1, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, dan S16) memiliki kemampuan untuk melisiskan bakteri *E. coli* NBRC 12713. Namun, ketika diuji terhadap *strain E. coli* NBRC 13965, hasilnya berbeda. Tidak semua sampel fag menunjukkan kemampuan lisis yang sama. Hanya fag S1, S3, S4, S5, S6, S9, S10, S13, dan S14 yang mampu melisiskan *E. coli* NBRC 13965. Selanjutnya, uji terhadap *E. coli* NBRC 13168 menunjukkan bahwa hanya fag S3 yang dapat melisiskan bakteri ini. Pada penelitian uji *host range* ini, fag S3 menunjukkan kisaran inang yang paling luas di antara semua fag yang diuji, yang mana fag S3 mampu menginfeksi semua *strain E. coli* yang digunakan pengujian ini yakni *E. coli* NBRC *E. coli* 12713, *E. coli* NBRC 13965, dan *E. coli* NBRC 13168.

Fag dengan kisaran inang luas lebih potensial sebagai agen antibiofilm karena biofilm sering kali mengandung komunitas mikroba yang beragam, dan keberadaan berbagai jenis bakteri dapat membuat terapi menjadi lebih sulit jika hanya menggunakan fag dengan kisaran inang sempit. Kemudian, fag dengan kisaran sempit sangat berguna dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri tertentu, sehingga mengurangi risiko disbiosis (ketidakseimbangan mikroba) di dalam tubuh (Holtappels *et al.*, 2023).

Keberhasilan fag dalam melisis inang pada penelitian ini disebabkan oleh kecocokan antara protein reseptor bakteriofag *E. coli* ATCC 25922 dengan protein reseptor pada membran luar bakteri inang, baik *E. coli* NBRC 12713, NBRC 13965, maupun NBRC 13168. Sebaliknya, kegagalan fag dalam melisis inang pada uji kisaran inang ini disebabkan oleh ketidaksesuaian antara protein reseptor fag dengan protein reseptor pada membran luar bakteri inang (Budiarti and Rusmana, 2018).

Dalam penelitian ini, digunakan tiga strain bakteri sebagai inang untuk menguji kisaran inang fag *E. coli* ATCC 25922, yaitu *E. coli* NBRC 12713, *E. coli* NBRC 13965, dan *E. coli* NBRC 13168. Ketiga inang tersebut sebelumnya telah digunakan dalam beberapa penelitian terdahulu salah satunya adalah penelitian Kenzaka *et al.* (2007), yang menemukan

bahwa *E. coli* NBRC 12713 adalah strain *non plaque forming*, yang berarti bakteri tersebut tidak menghasilkan plak dalam uji infeksi fag pada penelitian tersebut. Selain itu, dengan menggunakan metode CPRINS-FISH (*Cycling Primed In Situ Amplification-Fluorescent In Situ Hybridization*), bakteri *E. coli* NBRC 12713 diketahui dapat menerima atau mengintegrasikan gen resistensi ampisilin (gen *bla*) melalui proses transduksi yang dimediasi oleh bakteriofag dari P1 dan T4GT7. Transduksi ini memungkinkan gen-gen resisten untuk berpindah dari satu bakteri ke bakteri lainnya, sehingga meningkatkan potensi penyebaran sifat resisten di antara populasi bakteri.

Pada penelitian ini, semua fag spesifik *E. coli* ATCC 25922 dapat melisis *E. coli* NBRC 12713. Hal ini menunjukkan bahwa fag spesifik *E. coli* ATCC 25922 memiliki potensi untuk mengurangi penyebaran gen resisten ampisilin (gen *bla*) dalam lingkungan bakteri, karena kemampuannya untuk melisis bakteri yang dapat membawa dan menyebarkan gen resisten seperti *E. coli* NBRC 12713.

Selain itu, penelitian lain oleh Atikana *et al.* (2021) menunjukkan bahwa *E. coli* NBRC 12965 dapat dilisis oleh bakteriofag yang berasal dari sampel air di Buleleng, Bali. Bakteriofag tersebut memiliki kode LIP113-Bp006 dan morfologi khas dengan kepala ikosahedral berdiameter 65 nm

serta ekor panjang non-kontraktile sepanjang 185 nm. Dari hasil analisis filogenetik, fag LIP113-Bp006 diklasifikasikan dalam ordo *Caudovirales* dan memiliki kemiripan genetik tinggi (93–100%) dengan *Enterobacteria phage EPS7*, yang merupakan anggota keluarga *Siphoviridae*, termasuk fag litik, memiliki kemampuan untuk memperbaiki kerusakan pada DNA-nya sendiri. Pada penelitian ini fag *E. coli* ATCC 25922 serupa dengan fag LIP113-Bp006 yakni mampu melisiskan *E. coli* NBRC 13965. Oleh karena itu, ada kemungkinan juga fag *E. coli* ATCC 25922 yang mampu melisiskan *E. coli* NBRC 13965 memiliki struktur fisik dan mekanisme infeksi yang serupa dengan fag LIP113-Bp006 dan *phage EPS7*. Namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengonfirmasi kemungkinan ini.

Selanjutnya, dalam penelitian Han *et al.* (2024) hasil pengujian *host range* menunjukkan fag KITO6 mampu menginfeksi *E. coli* NBRC 13168, yang ditandai dengan terbentuknya *clear zone*. Selain itu, fag KITO6 juga terbukti efektif melisiskan *E. coli* ATCC 700609, yang resisten terhadap nalidixic acid. Pada penelitian ini, fag S3 memiliki kemampuan infeksi yang serupa dengan *phage KIT 06* yakni mampu melisiskan inang *E. coli* NBRC 13168. Oleh karena itu, ada kemungkinan, fag S3 juga berpotensi untuk dapat melisiskan *E. coli* ATCC 700609, yang resisten terhadap nalidixic acid.

Namun, untuk mengonfirmasi kemungkinan ini, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan.

C. Hasil Uji Antibiofilm

1. Hasil Uji Pembentukan Biofilm *Escherichia coli* ATCC 25922

Pada penelitian ini, uji pembentukan biofilm dilakukan dengan metode *microtiter plate assay* (MtP) (Haney *et al.*, 2021). Berdasarkan Tabel 4.3 hasil uji pembentukan biofilm menunjukkan bakteri *E. coli* ATCC 25922 terbukti positif membentuk biofilm dilihat dari nilai *optical density* (OD) bakteri yang diperoleh sebesar 0,530, angka tersebut lebih besar dibandingkan dengan nilai OD *cut-off* kontrol negatif-nya sebesar 0,153. Kemudian nilai OD *E. coli* ATCC 25922 dibandingkan dengan data pada Tabel 3.2 Interpretasi dari produksi biofilm, hasilnya biofilm yang dibentuk *E. coli* ATCC 25922 pada penelitian ini termasuk dalam kategori pembentuk biofilm sedang.

Tabel 4. 3 Hasil uji pembentukan biofilm *E. coli* ATCC 25922
(Dokumentasi Penelitian, 2024)

Bakteri Uji	Perlakuan	Nilai OD ₅₉₅ Pengulangan			Rata-rata
		I	II	III	
<i>E. coli</i>	K (-)	0,1527	0,1531	0,1532	0,153
	<i>E. coli</i>	0,725	0,6817	0,6471	0,6846

Pembentukan biofilm oleh *E. coli* pada suatu permukaan bertujuan untuk melindungi eksistensinya dari faktor-faktor lingkungan yang dapat merugikan pertumbuhannya, serta mempermudah *E. coli* dalam memperoleh nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhannya (Kumar *et al.*, 2017 *as cited in* Rahma & Warella, 2024). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *E. coli* ATCC 25922 dapat membentuk biofilm di mikropate ketika diinkubasi dalam media yang kaya nutrisi dan pada suhu yang sesuai (Dong *et al.*, 2019).

Hasil positif dari uji pembentukan biofilm *E. coli* ATCC 25922 pada penelitian ini sejalan dan lebih baik dari penelitian sebelumnya yakni oleh Brás dkk., (2024) yang melaporkan bahwa *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat membentuk biofilm, namun dengan kategori lemah. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm, diantaranya suhu, komposisi media, permukaan media perlekatan, dan durasi inkubasi. Hasil penelitian Nesse *et al.* (2014) menunjukkan bahwa isolat *E. coli* O103:H2 menghasilkan lebih banyak biofilm pada suhu 20°C dibandingkan dengan isolat *E. coli* O103:H25 pada suhu 37°C. Dalam penelitian ini yang mengacu pada (Haney *et al.*, 2021), digunakan suhu 30°C sehingga *E. coli* ATCC 25922 positif menghasilkan biofilm dengan kategori sedang. Sedangkan dari hasil penelitian Brás dkk., (2024) suhu

yang digunakan untuk inkubasi *Escherichia coli* ATCC 25922 sehingga membentuk biofilm yang lemah adalah 37 °C.

Kemudian, komposisi nutrisi dalam media pertumbuhan juga sangat mempengaruhi pembentukan biofilm. Penambahan nutrisi, seperti nitrogen (N) dan fosfor (P), dapat meningkatkan ekspresi gen yang terkait dengan pembentukan biofilm Chen *et al.* (2018). Dalam penelitian ini, media yang digunakan untuk menumbuhkan *E. coli* adalah media 802, yang komposisinya terdiri dari polipepton, ekstrak ragi, MgSO₄, dan agar. Nitrogen tersedia dalam media 802 melalui polipepton dan ekstrak ragi, sementara fosfor terkandung dalam ekstrak ragi. Sedangkan dalam penelitian Brás dkk., (2024) media yang digunakan untuk menghasilkan biofilm *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah *Tryptic Soy Broth* (TSB).

Selanjutnya, sifat permukaan. Permukaan *mikroplate* memiliki sifat yang kasar, permukaan plastik yang hidrofobik cenderung mendukung pembentukan biofilm yang lebih besar dibandingkan dengan baja tahan karat atau kaca (Ballén *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini, maupun penelitian Brás dkk., (2024) proses pembentukan biofilm *Escherichia coli* ATCC 25922 sama-sama dilakukan menggunakan *96-well microplates*. Selain itu, durasi inkubasi juga mempengaruhi tahap perkembangan biofilm, mulai dari fase reversibel, adhesi, hingga maturasi struktur biofilm yang lebih kompleks

(Ballén *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini, inkubasi dilakukan selama 18 jam (*overnight*). Sedangkan pada penelitian Brás dkk., (2024) waktu inkubasi dilakukan selama 24 jam.

Dari sisi visualisasi, bukti dari *E. coli* ATCC 25922 membentuk biofilm terlihat pada Gambar 4.4 yang menunjukkan sumuran *microplate* berisi bakteri *E. coli* ATCC 25922 (A) berwarna lebih ungu dibanding dengan sumuran (B) berisi akuades yang terlihat lebih jernih. Warna ungu pada sumuran (A) merupakan zat warna yang terikat pada biofilm, yang dapat diasumsikan berkaitan dengan jumlah biofilm *E. coli* ATCC 25922 yang terbentuk dalam sumuran.



Gambar 4. 4 Bakteri *E. coli* ATCC 25922 (A), kontrol negatif (B) (Dokumentasi Penelitian, 2024)

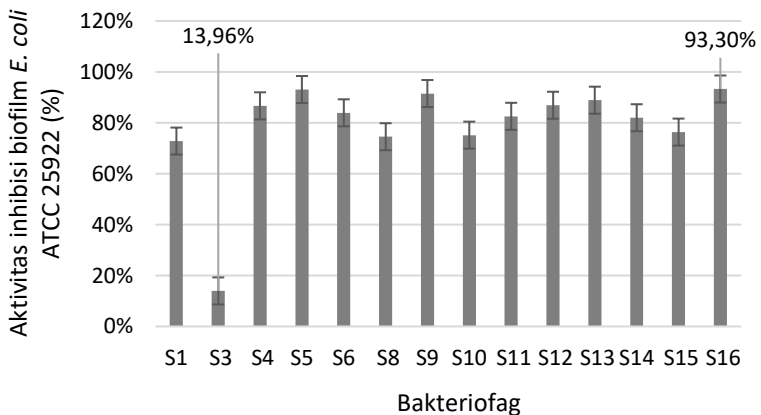
Proses pembentukan dan kestabilan warna kristal violet pada biofilm *E. coli* yang menempel pada sumuran pada dasarnya mengikuti mekanisme pewarnaan gram yang umum digunakan (Haney *et al.*, 2021). Sebagai bakteri gram negatif, *E. coli* memiliki struktur dinding sel yang padat, terdiri dari lapisan peptidoglikan dan asam teikoat, yang berfungsi mencegah lisis osmotik pada sel protoplasma serta menghalangi keluarnya kristal violet saat proses pembilasan.

Kestabilan warna ungu pada sumuran ini kemudian digunakan untuk mengevaluasi kemampuan bakteriofag dalam memanipulasi biofilm *E. coli* yang terbentuk (Waturangi, D. E., 2023).

2. Hasil Uji Inhibisi dan Eradikasi Biofilm *Escherichia coli* ATCC 25922

Sebelum pengujian inhibisi maupun eradikasi biofilm dilakukan, semua sampel fag terlebih dahulu dihitung konsentrasinya melalui uji *spot titer* dengan tujuan untuk memastikan jumlah bakteriofag dan memudahkan proses evaluasi efektivitas bakteriofag dalam menginhibisi maupun mengeradikasi biofilm. Hasil uji *spot titer* dari semua sampel fag dapat dilihat pada tabel 4.4. Semua fag menunjukkan konsentrasi yang bervariasi kecuali fag S2. Fag S2 diketahui tidak membentuk *clear zone* dalam uji *spot titer*. Hal ini mengindikasikan bahwa fag S2 kehilangan kemampuan dalam menginfeksi inang *E. coli* ATCC 25922 sehingga tidak bisa digunakan dalam proses pengujian antibiofilm. Penurunan nilai titer bakteriofag selama penyimpanan kemungkinan menjadi faktor hilangnya kemampuan bakteriofag S2 untuk menginfeksi bakteri inangnya (Alvi *et al.*, 2018; Nurrizkiawan *et al.*, 2023). Kondisi hilangnya efektifitas fag karena kehilangan nilai titer, tidak dapat dipulihkan, sehingga fag S2 tidak disertakan pada pengujian lanjutan.

Pada uji inhibisi biofilm, semua sampel fag yang digunakan dibuat agar memiliki konsentrasi yang sama, yakni 1×10^4 PFU/mL, Tujuannya untuk mengurangi variabilitas yang mungkin terjadi akibat perbedaan jumlah bakteriofag sehingga memungkinkan perbandingan hasil uji efektifitas bakteriofag dalam menghambat pembentukan biofilm lebih akurat. Hasil uji inhibisi pembentukan biofilm *E. coli* ATCC 25922 oleh bakteriofag dapat dilihat pada Gambar 4.5 dibawah ini.



Gambar 4. 5 Aktivitas Inhibisi biofilm *E. coli* ATCC 25922 oleh bakteriofag (Dokumentasi Penelitian, 2024)

Hasil uji inhibisi menunjukkan aktivitas inhibisi terendah dimiliki oleh sampel S3 dengan nilai 13,97%. Sementara, aktivitas inhibisi tertinggi dimiliki oleh sampel S16 dengan nilai 93,32%. Berdasarkan Gambar 4.5 masing-masing sampel

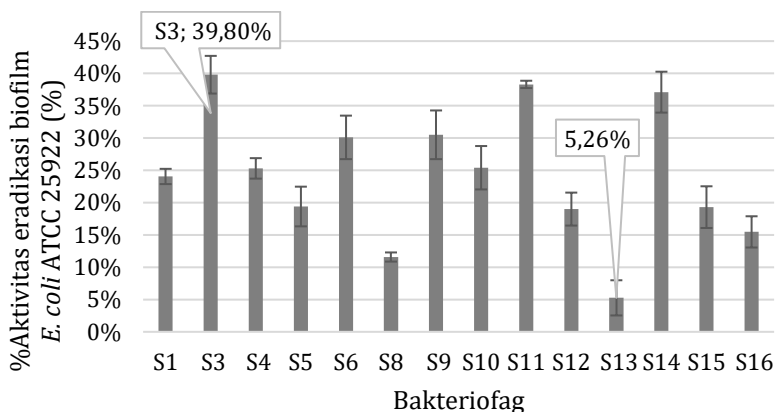
fag dengan konsentrasi yang sama menunjukkan aktivitas inhibisi biofilm yang berbeda-beda. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yakni jenis medium yang digunakan, waktu inkubasi, kerapatan sel inang, suhu dan jenis bakteriofag dapat mempengaruhi variasi pada hasil uji inhibisi (Waturangi, D. E., 2023). Pada penelitian ini, jenis medium, waktu inkubasi, kerapatan sel inang dan suhu yang digunakan adalah sama. Sehingga perbedaan yang terjadi pada hasil uji inhibisi biofilm *E. coli* ATCC 25922 kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan jenis bakteriofag.

Hasil uji inhibisi menunjukkan bahwa bakteriofag mampu menghancurkan inang *E. coli* terlebih dahulu sebelum biofilm terbentuk. Bakteriofag menggunakan enzim lisozim untuk memecah ikatan β -1,4-glycosidic antara N-acetylglucosamine, yang menyebabkan dinding sel bakteri berlubang. Proses ini memungkinkan bakteriofag untuk melakukan penetrasi lebih lanjut dan akhirnya melisis inang Walmagh *et al.*, (2012). Infeksi fag yang menyebabkan kematian sel inang secara kolektif membuat kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm berkurang (Triana, 2018).

Selanjutnya pada uji eradikasi biofilm *E. coli* ATCC 25922 digunakan 14 fag dengan konsentrasi yang berbeda yang tertera pada Tabel 4.4.

Tabel 4. 4 Titer fag yang digunakan pada pengujian eradikasi biofilm *E. coli* ATCC 25922

No.	Sampel	PFU/mL	No.	Sampel	PFU/mL
1.	Fag S1	1×10^4	8.	Fag S10	1×10^7
2.	Fag S3	1×10^8	9.	Fag S11	1×10^9
3.	Fag S4	1×10^9	10.	Fag S12	1×10^7
4.	Fag S5	1×10^5	11.	Fag S13	1×10^5
5.	Fag S6	1×10^8	12.	Fag S14	1×10^7
6.	Fag S8	1×10^7	13.	Fag S15	1×10^4
7.	Fag S9	1×10^6	14.	Fag S16	1×10^6



Gambar 4. 6 Aktivitas eradikasi biofilm *E. coli* ATCC 25922 oleh bakteriofag (Dokumentasi Penelitian, 2024)

Berdasarkan Gambar 4.6 hasil uji aktivitas eradikasi biofilm *E. coli* ATCC 25922 pada penelitian ini menunjukkan fag S3 dengan konsentrasi 1×10^8 PFU/mL memiliki aktivitas eradikasi tertinggi dengan nilai 39,8%. Sementara itu, aktivitas eradikasi terendah dipegang oleh fag S13 dengan titer 1×10^4

PFU/mL nilai 5,26%. Dari hasil uji eradikasi dimana fag S3 dengan konsentrasi lebih tinggi dari fag S13 memiliki aktivitas eradikasi lebih tinggi dari fag S13 hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa konsentrasi fag yang lebih tinggi meningkatkan aktivitas eradikasi biofilm.

Namun dari hasil uji eradikasi pada penelitian ini, terdapat temuan yang menarik, dimana fag S3 aktivitas eradikasinya lebih tinggi jika dibandingkan dengan fag S11 meskipun konsentrasi fag S11 jauh lebih tinggi. Secara teori, konsentrasi fag yang lebih tinggi seharusnya meningkatkan aktivitas eradikasi biofilm. Temuan ini kemungkinan terjadi karena beberapa faktor diantaranya adalah aktivitas enzimatis. Beberapa fag memiliki enzim depolimerase yang membantu menghancurkan matriks ekstraseluler biofilm (Hans, 2022). Diketahui fag S3 memiliki *halozone* pada plak nya, dimana terbentuknya *halozone* menandakan bakteriofag memiliki enzim depolimerase, sedangkan fag S11 dilihat dari segi morfologi plaknya tidak membentuk *halozone*, yang berarti fag tidak memiliki enzim depolimerase. Sehingga karena fag S3 memiliki enzim depolimerase sedangkan fag S11 tidak, maka fag S3 akan lebih efektif dalam mengeraseik biofilm meskipun konsentrasinya lebih rendah.

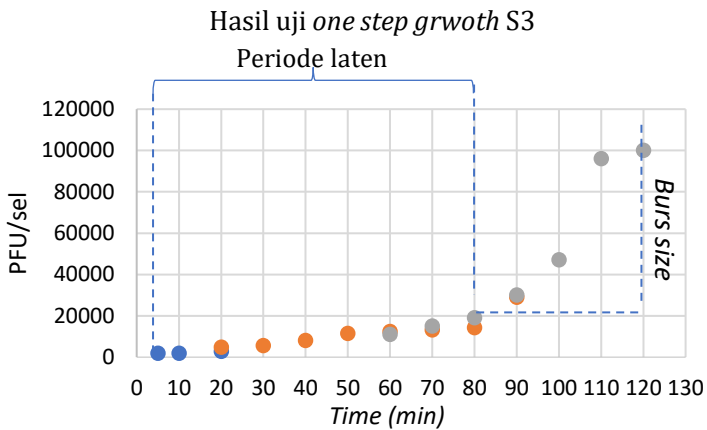
Biofilm secara alami dapat melepaskan diri dari koloni induknya sebagai mekanisme dispersi untuk mencari

tempat/daerah kolonisasi yang baru. Proses dispersi melibatkan komunikasi (*quorum sensing*) diantara bakteri-bakteri dalam biofilm untuk melepaskan diri dari biofilm induk. Untuk itu, bakteri akan menghasilkan enzim-enzim yang dapat menghidrolisis matriks biofilm (Costerton *et al.*, 1995). Matriks biofilm bakteri pada umumnya berupa polisakarida, sehingga dapat dicerna oleh enzim-enzim polisakarida liase yang termasuk enzim hidrolase atau depolimerase. Bakteriofag menghasilkan enzim depolimerase sehingga mampu mendegradasi matriks EPS biofilm (Chan dan Abedon, 2015). Hal tersebut menjadi dasar pemanfaatan bakteriofag untuk mendegradasi biofilm bakteri.

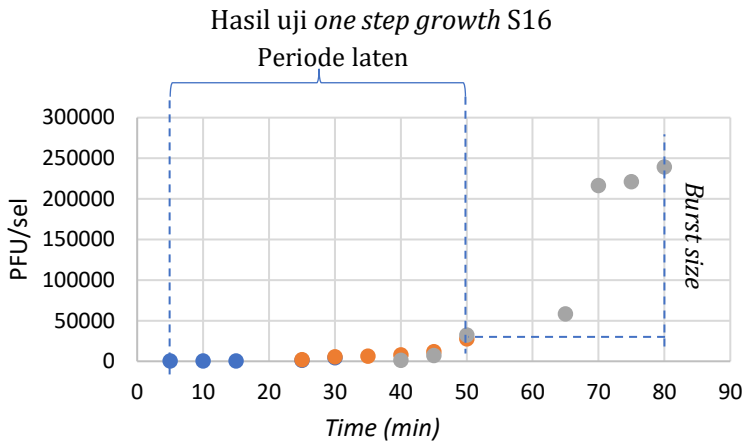
Aktivitas degradasi biofilm *E. coli* ATCC 25922 terjadi karena biofilm yang telah lebih dahulu terbentuk, didegradasi oleh bakteriofag. Kemampuan bakteriofag dalam mendegradasi biofilm disebabkan aktivitas enzim polisakarida lyase (depolimerase) yang dihasilkannya (Pratiwi, 2021). Enzim tersebut secara spesifik mendegradasi senyawa matriks polimerik ekstraselular pada biofilm. Selain itu, bakteriofag menyerang dan mampu melisis sel bakteri *E. coli* EC 3, sehingga sel-sel bakteri mati. Akibatnya komunikasi antar sel sebagian terputus sehingga pertahanan biofilm menurun dan fragmen biofilm terlepas.

D. Kurva *One step growth* Bakteriofag Spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922

Pengujian *one-step growth* bertujuan untuk mengetahui durasi periode laten dan *burst size* (Kropinski, 2018). Hasil uji *one-step growth* untuk S3 dan S16 dapat dilihat pada Gambar 4. 7 dan Gambar 4. 8.



Gambar 4. 7 Kurva *one step growth* S3
(Dokumentasi Penelitian, 2024)



Gambar 4.8 Kurva *one step growth* S16
(Dokumentasi Penelitian, 2024)

Keterangan:

Temuan	S3	S16
Fase laten	75 menit	50 menit
Fase <i>burst size</i>	45 menit	30 menit
Ukuran <i>burst size</i>	14 PFU/sel	56 PFU/sel

Berdasarkan hasil uji *one-step growth* S3 yang ditampilkan pada Gambar 4.8, menunjukkan fase laten S3 berlangsung selama 75 menit, dimulai dari menit ke-5 hingga menit ke-80. Lalu, fase *burst size* S3 berlangsung pada menit ke-80 hingga menit ke-120. Sementara itu, hasil uji *one-step growth* S16 pada Gambar 4.7 menunjukkan fase laten S16 berlangsung selama 45 menit, dimulai dari menit ke-5 hingga

menit ke-50. Kemudian, fase *burst* S16 berlangsung selama 30 menit, yaitu dari menit ke-50 hingga menit ke-80. Berdasarkan perhitungan, S3 memiliki *burst size* sebesar 14 PFU/sel, sedangkan S16 memiliki *burst size* yang lebih besar, yaitu mencapai 56 PFU/sel.

Variasi dalam periode laten dan ukuran *burst size* bakteriofag yang dihasilkan oleh S3 dan S16 dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yakni jenis medium yang digunakan, kerapatan sel inang, suhu dan jenis bakteriofag dapat mempengaruhi variasi pada periode laten dan ukuran *burts size* yang dihasilkan (Nabergoj *et al.* (2018). Pada penelitian ini, kondisi medium, kerapatan sel inang dan suhu yang digunakan adalah sama. Sehingga perbedaan yang terjadi pada periode laten dan *burst size* antara S3 dan S16 kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan jenis bakteriofag S3 dengan S16.

Durasi fase laten S16 yang lebih pendek dari S3 mengindikasikan bahwa S16 lebih efisien dalam menginfeksi sel inang dan memulai proses replikasi. Selain memiliki fase laten yang lebih pendek, S16 juga menunjukkan fase *burst size* yang lebih awal, yang berarti ia dapat menghasilkan partikel baru lebih cepat setelah infeksi. Ukuran *burst size* yang lebih besar pada S16 menandakan efisiensinya dalam memproduksi partikel baru setelah menginfeksi sel inang, menjadikannya lebih efektif dalam mengendalikan populasi bakteri target

dibandingkan dengan S3. Dengan ukuran burst size yang lebih besar juga, S16 mungkin lebih efektif dalam aplikasi terapi antibakteri karena dapat menghasilkan lebih banyak partikel fag untuk menyerang bakteri dalam waktu yang lebih singkat.

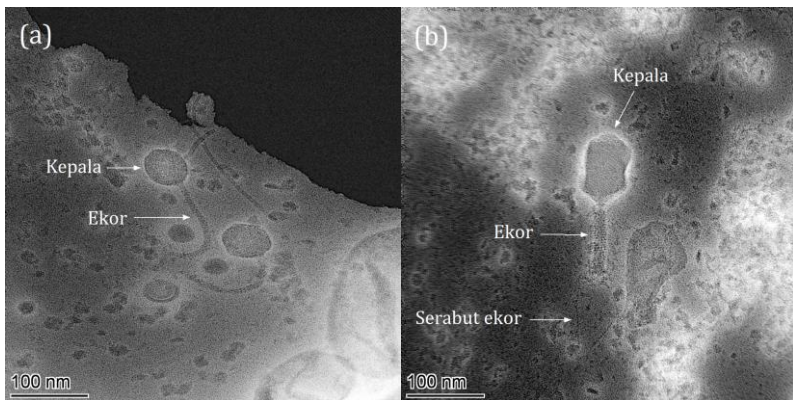
E. Karakterisasi Morfologi Bakteriofag Spesifik

***Eshcherichia coli* ATCC 25922 Menggunakan Mikroskop Transmisi Elektron (TEM)**

Karakterisasi morfologi bakteriofag menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) pada penelitian ini dilakukan hanya pada sampel fag yang memiliki aktivitas inhibisi biofilm tertinggi dan aktivitas eradikasi biofilm tertinggi. Hal tersebut dikarenakan terbatasnya biaya penelitian sehingga tidak semua sampel fag dikarakterisasi morfologinya menggunakan TEM. Berdasarkan hasil seleksi berdasarkan hasil uji antibiofilm, S16 dipilih karena memiliki aktivitas inhibisi biofilm tertinggi, dan S3 dipilih karena memiliki aktivitas eradikasi biofilm tertinggi. Pengamatan morfologi bakteriofag dilakukan setelah sampel S3 dan S16 dipropagasi hingga mencapai nilai titer 1×10^8 PFU/mL. Hal ini dilakukan untuk menghasilkan gambaran yang jelas dalam analisis Mikroskop Elektron Transmisi (TEM), karena konsentrasi fag yang rendah dapat menyulitkan proses

visualisasi akibat jumlah partikel fag yang tidak mencukupi untuk memberikan hasil yang representatif.

Dari hasil pengamatan menggunakan Mikroskop Elektron Transmisi (TEM), karakteristik morfologi S3 dengan S16 menunjukkan perbedaan yang signifikan, seperti yang terlihat dalam Gambar 4.9.



Gambar 4. 9 Morfologi bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922. Fag S3 (a), fag S16 (b) (Dokumentasi Penelitian, 2024)

Keterangan:

No	Karakteristik	Fag S3	Fag S16
1.	Bentuk Kepala	Polihedral	Ikosahedral
2.	Diameter kepala	53 nm	90 nm
3.	Bentuk ekor	Non-kontraktil	Kontraktil
4.	Panjang ekor	125 nm	82 nm
5.	Panjang serabut ekor	-	104 nm
6.	Famili	Siphoviridae	Myoviridae
7.	Genus	λ	T4
8.	Siklus hidup	Lisogenik	Litik

Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan TEM, S3 memiliki bentuk kepala polihedral dengan diameter sekitar 53 nm dan S16 memiliki bentuk kepala ikosahedral dengan diameter sekitar 90 nm. Selanjutnya, dari hasil pengamatan bentuk ekor, S16 memiliki bentuk ekor besar kontraktil dengan panjang sekitar 82 nm dengan serabut ekor yang memiliki panjang 104 nm, sedangkan S3 memiliki bentuk ekor panjang non-kontraktil ~ 125 nm.

Menurut(Ackermann, 2009) fag dengan kepala ikosahedral dan ekor kontraktil serta memiliki serabut ekor diklasifikasikan ke dalam family Myoviridae, genus T4. Famili Myoviridae merupakan fag yang virulen/litik, sehingga tidak mengintegrasikan materi genetiknya ke inang (siklus lisogeni) tetapi langsung membunuh inang (siklus litik). Sedangkan fag dengan bentuk kepala polihedral dan ekor non-kontraktil panjang diklasifikasikan ke dalam family Siphoviridae, genus Lambda. Famili Siphoviridae, dikenal dapat menjalani siklus hidup lisogenik, dimana DNA fag dapat terintegrasi ke dalam genom bakteri inang sebagai profag.

Berkaitan dengan karakteristik plak bakteriofag, jenis bakteriofag yang masuk ke dalam famili Myoviridae akan menghasilkan plak bening karena sifat litiknya yang mampu mengancurkan semua sel inang, sedangkan pada famili Siphoviridae akan menghasilkan plak yang keruh, karena

siklus lisogeniknya memungkinkan sebagai besar sel inang tetap hidup (Narulita *et al.*, 2018). Pada penelitian ini, berdasarkan hasil purifikasi yang terlampir di Tabel 4.2 S3 membentuk plak keruh sedangkan S16 membentuk plak bening. Temuan ini mendukung kesimpulan bahwa S3 adalah fag lisogen sementara S16 merupakan fag litik.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Hasil isolasi menunjukkan bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922 berhasil didapatkan dari sampel air limbah yang berasal dari selokan jalan raya Ngaliyan Semarang, selokan Laboratorium FST UIN Walisongo Semarang, dan selokan tempat pemotongan ayam di Pasar Ngaliyan Semarang. Namun, bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922 tidak berhasil didapatkan pada sampel air selokan rumah makan Tanjung Sari, Ngaliyan, Semarang.
2. Hasil karakteristik bakteriofag spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa plak yang terbentuk oleh bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922 terdiri dari empat tipe, yaitu: plak bening dengan *halozone*, plak keruh dengan *halozone*, plak keruh tanpa *halozone*, dan plak bening tanpa *halozone*. Kemudian dari hasil uji *host range* menunjukkan bahwa fag S3 menunjukkan spektrum lisis yang paling luas diantara fag lainnya dengan kemampuannya untuk menginfeksi tidak hanya *E. coli* ATCC 25922, tetapi juga ketiga strain *E. coli* NBRC (12713, 13965, dan 13168). Hal ini menunjukkan fag S3 lebih potensial sebagai agen

antibiofilm dibanding fag lainnya pada penelitian ini. Hasil uji *one step growth* menunjukkan fag S16 memiliki potensi yang lebih baik sebagai agen antibakteri dibandingkan dengan fag S3. Hal ini disebabkan oleh efisiensi fag S16 dalam menginfeksi sel inang dan kemampuannya untuk menghasilkan lebih banyak partikel fag baru dalam waktu yang lebih singkat untuk menyerang bakteri, dibandingkan dengan fag S3. Kemudian, dari hasil pengamatan menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (TEM), menunjukkan bahwa fag S3 termasuk famili Siphoviridae yang memiliki diameter kepala polisahedral sekitar 53 nm dan panjang ekor non-kontraktil sekitar 125 nm. Sementara itu, fag S16 termasuk famili Myoviridae yang memiliki diameter kepala ikosahedral 90 nm, panjang ekor kontraktil sekitar 82 nm, dan panjang serabut ekor sekitar 104 nm.

3. Hasil penelitian mengenai aktivitas antibiofilm terhadap *E. coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa fag S16 memiliki aktivitas penghambatan/inhibisi tertinggi, dengan nilai penghambatan/inhibisi mencapai 93,32%. Selanjutnya, berdasarkan hasil uji penghancuran/eradikasi biofilm, fag S3 menunjukkan aktivitas penghancuran/eradikasi tertinggi, dengan nilai eradikasi mencapai 39,8%.

B. Saran

1. Perlu dilakukan uji identifikasi berbasis pengurutan genom (genome sequencing) untuk memastikan jenis dari kedua isolat, yaitu fag S3 dan fag S16.
2. Perlu dilakukan karakterisasi kestabilan fag S16 dan S3 serta analisis terhadap protein yang berperan dalam melisiskan sel bakteri pada kedua fag tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90.
<https://doi.org/10.1071/MA11090>
- Aji Handoko, Y. (2021). *ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG SplendidRed DAN MarvelLand SEBAGAI BIOKONTROL BAKTERI PEMBUSUK BUAH CABAI MERAH (Capsicum annuum L.)* [PhD Thesis, Universitas Brawijaya].
<http://repository.ub.ac.id/185533/>
- Arivo, D., & Sjahriani, T. (2019). ISOLASI, EFEKTIVITAS, DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG LITIK Salmonella enterica SEBAGAI BIOKONTROL PENYAKIT GASTROENTERITIS. *Mandala Of Health*, 12(2), 169.
<https://doi.org/10.20884/1.mandala.2019.12.2.2024>
- ATCC. (2024). *Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers—25922 | ATCC*.
<https://www.atcc.org/products/25922>
- Atikana, A., Fujita, K., Prima, A., Yopi, Kawasaki, H., Suzuki, K.-I., & Lisdiyanti, P. (2021). EPS7-like Enterobacteria phage Isolated from Indonesia. *Microbiology Indonesia*, 15(1), 2–2. <https://doi.org/10.5454/mi.15.1.2>
- Ballén, V., Cepas, V., Ratia, C., Gabasa, Y., & Soto, S. M. (2022). Clinical *Escherichia coli*: From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. *Microorganisms*, 10(6), 1103.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10061103>
- Brás, A., Braz, M., Martinho, I., Duarte, J., Pereira, C., & Almeida, A. (2024). Effect of Bacteriophages against Biofilms of *Escherichia coli* on Food Processing Surfaces. *Microorganisms*, 12(2), 366.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12020366>
- Budiarti, S., & Rusmana, I. (2018). *Eksplorasi dan Karakterisasi Bakteriofag*. PT Penerbit IPB Press.

- Carascal, M. B., Dela Cruz-Papa, D. M., Remenyi, R., Cruz, M. C. B., & Destura, R. V. (2022). Phage Revolution Against Multidrug-Resistant Clinical Pathogens in Southeast Asia. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 820572. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.820572>
- Chen, X. P., Ali, L., Wu, L.-Y., Liu, C., Gang, C. X., Huang, Q. F., Ruan, J. H., Bao, S. Y., Rao, Y. P., & Yu, D. (2018). Biofilm Formation Plays a Role in the Formation of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Toward Nutrients in Microcosm Experiments. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 367. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00367>
- Deshanda, R. P., Lingga, R., Hidayati, N. A., Sari, E., & Hertati, R. (2019). FAG Salmonella ASAL LIMBAH PASAR IKAN DAN AIR SUNGAI DI SEKITAR KAMPUS UNIVERSITAS BANGKA BELITUNG. *EKOTONIA: Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi dan Mikrobiologi*, *3*(2), 45–49. <https://doi.org/10.33019/ekotonia.v3i2.758>
- Dewanggana, M. N., Evangeline, C., Ketty, M. D., Waturangi, D. E., Yogiara, & Magdalena, S. (2022). Isolation, characterization, molecular analysis and application of bacteriophage DW-EC to control Enterotoxigenic *Escherichia coli* on various foods. *Scientific Reports*, *12*(1), 495. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04534-8>
- Fadhila, F., & Sari, S. R. (2019). Gambaran Pembentukan Biofilm *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Air Bersih Perpipaian. *The 1st Proceeding Publication of Creativity and Research Medical Laboratory Technology DIV*, *1*(1), 73–77.
- Franswinsly, B., & Savira, M. (2023). *Isolasi bakteriofag dari limbah cair dengan aktivitas litik terhadap Escherichia coli*.
- Gallet, R., Kannoly, S., & Wang, I.-N. (2011). Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiology*, *11*(1), 181.

- <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-181>
- Gutiérrez, D. (2016). *Bacteriophages: The Enemies of Bad Bacteria Are Our Friends!* · *Frontiers for Young Minds*. <https://kids.frontiersin.org/articles/10.3389/frym.2016.00030>
- Hakim, M. S., & Jariah, R. O. A. (2023, June 22). *Mengenal bakteriofag: Virus baik yang melawan infeksi bakteri mirip antibiotik*. *The Conversation*. <http://theconversation.com/mengenal-bakteriofag-virus-baik-yang-melawan-infeksi-bakteri-mirip-antibiotik-206949>
- Haney, E. F., Trimble, M. J., & Hancock, R. E. W. (2021). Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nature Protocols*, *16*(5), 2615–2632. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00515-3>
- Hans, R. (2022, April). *Apa Penyebab Halo Plakat Fag? | Fag*. <https://www.thephage.xyz/2022/04/09/what-causes-phage-plaque-halo/>
- Hardanti, S., Wardani, A. K., & Rukmi, W. D. (2018). Isolasi dan karakterisasi bakteriofag spesifik *Salmonella typhi* dari kulit ayam. *Jurnal Teknologi Pertanian*, *19*(2), 107–116.
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2017). Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*, *11*(7), 1511–1520. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
- INACC-BRIN. (2024). *INACC-BRIN*. <https://inacc.brin.go.id/index.php/Katalog/bakteriophage>
- Jatmiko, Y. D., Purwanto, A. P., & Ardyati, T. (2018). Uji Aktivitas Bakteriofage Litik dari Limbah Rumah Tangga Terhadap *Salmonella Typhi*. *Jurnal Biodjati*, *3*(2), 134–147. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v3i2.3471>

- Jo, S. J., Kwon, J., Kim, S. G., & Lee, S.-J. (2023). The Biotechnological Application of Bacteriophages: What to Do and Where to Go in the Middle of the Post-Antibiotic Era. *Microorganisms*, *11*(9), 2311.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11092311>
- Kropinski, A. M. (2018). Practical Advice on the One-Step Growth Curve. In M. R. J. Clokie, A. M. Kropinski, & R. Lavigne (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 3* (pp. 41–47). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3
- Kusmiatun, A., Rusmana, I., & Budiarti, S. (2015). Characterization of Bacteriophage Specific to *Bacillus pumilus* from Ciapus River in Bogor, West Java, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, *22*(1), 27–33.
<https://doi.org/10.4308/hjb.22.1.27>
- Lingga, R., Budiarti, S., Rusmana, I., & Wahyudi, A. T. (2020). Isolation, characterization and efficacy of lytic bacteriophages against pathogenic *Escherichia coli* from hospital liquid waste. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *21*(7).
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d210745>
- Masrukhin, M., Setiawan, R., Kusmiati, M., & Saputra, S. (2021). Optimasi pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* melalui penambahan glukosa dan NaCl. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, *7*(1), 342–347.
<https://journal3.uinalauddin.ac.id/index.php/psb/article/view/24700>
- Minogue, T. D., Daligault, H. A., Davenport, K. W., Bishop-Lilly, K. A., Broomall, S. M., Bruce, D. C., Chain, P. S., Chertkov, O., Coyne, S. R., Freitas, T., Frey, K. G., Gibbons, H. S., Jaissle, J., Redden, C. L., Rosenzweig, C. N., Xu, Y., & Johnson, S. L. (2014). Complete Genome Assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a Serotype O6 Reference Strain. *Genome Announcements*, *2*(5), e00969-14.

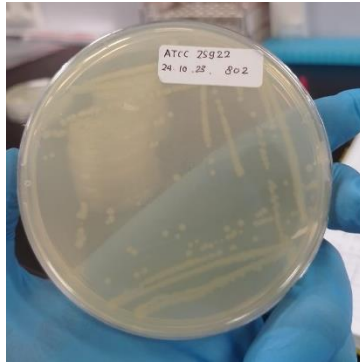
- <https://doi.org/10.1128/genomeA.00969-14>
- Moons, P., Faster, D., & Aertsen, A. (2013). Lysogenic Conversion and Phage Resistance Development in Phage Exposed *Escherichia coli* Biofilms. *Viruses*, 5(1), 150–161. <https://doi.org/10.3390/v5010150>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Mursyida, E., Misfa, O., Pratiwi, S. B., & Shinde, A. (2023). In Vitro Sensitivity Test of *Escherichia coli* ATCC 25922 to Various Antibiotics with Well Diffusion Method. *Jurnal Kesehatan Prima*, 17(2), 42. <https://doi.org/10.32807/jkp.v17i2.1003>
- Nabergoj, D., Modic, P., & Podgornik, A. (2018). Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *MicrobiologyOpen*, 7(2), e00558. <https://doi.org/10.1002/mbo3.558>
- Narulita, E., Sulistyorini, I., Aji, G. P., Iqbal, M., & Murdiyah, S. (2018). Isolation and characterization of bacteriophage in controlling *Escherichia coli* in Jember Area, Indonesia. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*, 19, 81–86.
- Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1387497. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1387497>
- Nesse, L. L., Sekse, C., Berg, K., Johannesen, K. C. S., Solheim, H., Vestby, L. K., & Urdahl, A. M. (2014). Potentially

- Pathogenic *Escherichia coli* Can Form a Biofilm under Conditions Relevant to the Food Production Chain. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2042–2049. <https://doi.org/10.1128/AEM.03331-13>
- Nurrizkiawan, Z., Brahmanti, A. A., & Wardani, A. K. (2023). Isolasi Bakteriofag dan Aplikasinya untuk Mengontrol Bakteri Patogen: Bakteriofag untuk Mengontrol Bakteri Patogen. *Tropical Microbiome*, 1(1), 1–12.
- O'Neill, J. (2016). *Review on antimicrobial resistance: Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*.
- O'Neill, J. (2019). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance; 2016 [Available from: <https://amr-review.org/Publications.Html>, 1–35.
- Oved, K. (2021). Fighting AMR with Host Immune Response Technology. *Drug Discovery Today*, 26(9), 2081–2083. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.036>
- Poxleitner, et al. (2018). *HHMI SEA-PHAGES phage discovery guide*.
- Pratiwi, R. H. (2021). Virus Bakteri sebagai Terapi untuk Penyakit Infeksi. *BIOEDUSAINS: Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains*, 4(2), 193–204. <https://doi.org/10.31539/bioedusains.v4i2.2331>
- Putri, F. F. (2024). *Potensi antibiofilm dan antibakteri cell-free supernatant (CFS) lactobacillus casei terhadap bakteri patogen oportunistik staphylococcus aureus* [PhD Thesis, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim]. <http://etheses.uin-malang.ac.id/id/eprint/65498>
- Rahayu, W. P. (2018). *Escherichia coli: Patogenitas, Analisis dan Kajian Risiko*. IPB Press. https://repository.um-surabaya.ac.id/9131/1/B4_Buku%20E.Coli.pdf
- Rahma, K., & Warella, J. C. (2024). PERTUMBUHAN BIOFILM *ESCHERICHIA COLI* PADA MEDIA TRYPTIC SOY BROTH.

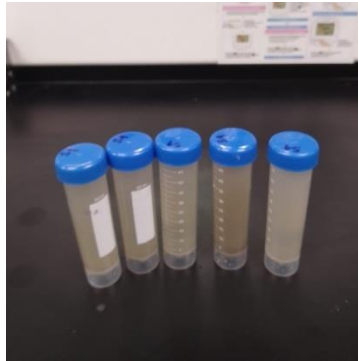
- Scientica: Jurnal Ilmiah Sains Dan Teknologi*, 2(4), 164–169.
- Ramesh, N., Archana, L., Madurantakam Royam, M., Manohar, P., & Eniyan, K. (2019). Effect of various bacteriological media on the plaque morphology of Staphylococcus and Vibrio phages. *Access Microbiology*, 1(4). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000036>
- Saefunida, D. S., Wijanarka, W., Rukmi, M. I., & Hidayat, N. N. (2016). Isolasi bakteriofag *Escherichia coli* dari sistem distribusi air minum isi ulang sebagai antibiofilm. *Jurnal Akademika Biologi*, 5(2), 68–75.
- Sari, S. (2022). Varying Morphology of *E.coli*—An Experimental Study. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 11(6), 262–265. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2022.1106.028>
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: Development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
- Subramanian, A. (2024). Emerging roles of bacteriophage-based therapeutics in combating antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1384164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1384164>
- Sulupadang, N. P., Kep, M., Idayanti, T., St, S., Si, S., Irma, A., Si, S., Si, M., Maliza, R., Si, S., Si, M., Hasanuddin, A. R. P., Si, S., Biomed, M., & Rachman, B. E. (2021). *PENERBIT CV. EUREKA MEDIA AKSARA*.
- Suprihati, B. (2017). Hubungan Biofilm dan Resistensi Bakteri dengan Respon Klinis Terapi Antibiotik Topikal pada Otitis Media Supuratif Kronis Benigna. *Medica Hospitalia : Journal of Clinical Medicine*, 3(3). <https://doi.org/10.36408/mhjcm.v3i3.228>
- Triana, T. (2018). AKTIVITAS ANTIBIOFILM BAKTERI *Escherichia coli* OLEH BAKTERIOFAG SECARA IN

- VITRO [*Escherichia coli* biofilm in vitro eradication by bacteriophage]. *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*, 17, 1–90.
- Wally, A. D., Pribadi, E. S., & Setyaningsih, S. (2021). Bakteriofag spesifik *Escherichia coli* yang diisolasi dari berbagai sumber air di Bogor Tengah, Kota Bogor sebagai antibiotika alternatif. *Jurnal Biologi Udayana*, 25(2), 183. <https://doi.org/10.24843/JBIOUNUD.2021.v25.i02.p10>
- Walmagh, M., Briers, Y., Santos, S. B. dos, Azeredo, J., & Lavigne, R. (2012). Characterization of Modular Bacteriophage Endolysins from Myoviridae Phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1. *PLOS ONE*, 7(5), e36991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036991>
- World Economic Forum. (2023). *Top 10 Emerging Technologies of 2023*. World Economic Forum. <https://www.weforum.org/publications/top-10-emerging-technologies-of-2023/in-full/>
- World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/112642>
- Yana, Y. (2023). LPPOM [LPPOM MUI]. *Kehalalan Obat, Apa Saja yang Perlu Diperhatikan?* <https://halalmui.org/kehalalan-obat-apa-saja-yang-perlu-diperhatikan/>
- Zhou, F., Wang, D., Hu, J., Zhang, Y., Tan, B. K., & Lin, S. (2022). Control Measurements of *Escherichia coli* Biofilm: A Review. *Foods*, 11(16), 2469. <https://doi.org/10.3390/foods11162469>

LAMPIRAN



Lampiran Gambar 1. 1 Isolat bakteri *E. coli* ATCC 25922

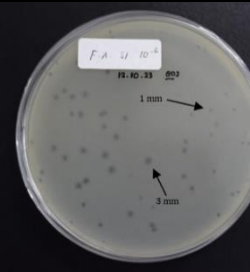
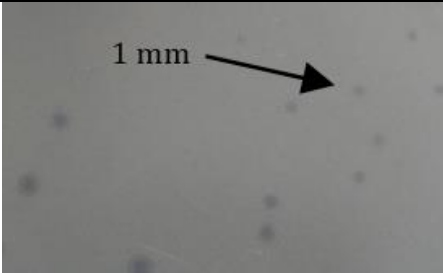
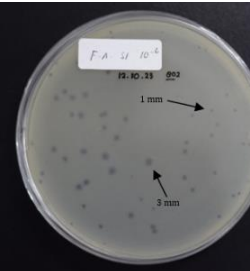
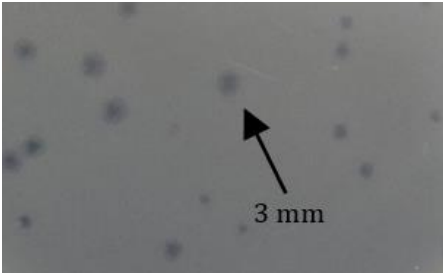


Lampiran Gambar 1. 2 Air limbah selokan yang diduga mengandung bakteriofag spesifik *E. coli* ATCC 25922

Lampiran Tabel 1. 1 16 Asal sampel, jenis metode, kode sampel fag, karakteristik fag spesifik *Escherichia coli* ATCC 25922

No	Asal Sampel	Metode Isolasi	Kode sampel fag	Karakteristik plak fag					
				Ukuran plak (mm)	Halo		Opalesensi		
					Ada	Tidak	<i>Clear</i>	<i>Claudy</i>	
1	Selokan Jalan Raya (SJR)	<i>Enrichment</i>	S1	1		×		×	
2			S2	3	×		×		
3			S7	7,5	×		×		
4			S8	3,4	×		×		
5	Selokan Laboratorium FST (SL)		S3	4,9	×			×	
6			S4	7,8	×		×		
7			S9	5,3	×			×	
8			S10	8,7	×		×		
9	Selokan Pematangan Ayam (SPA)		S5	2,6		×	×		
10			S6	2		×	×		
11			S11	1,8		×	×		
12			S12	4,7	×		×		
13			<i>Direct</i>	S13	1,4		×	×	
14				S14	3		×	×	
15				S15	1,6		×	×	
16				S16	2,4		×	×	

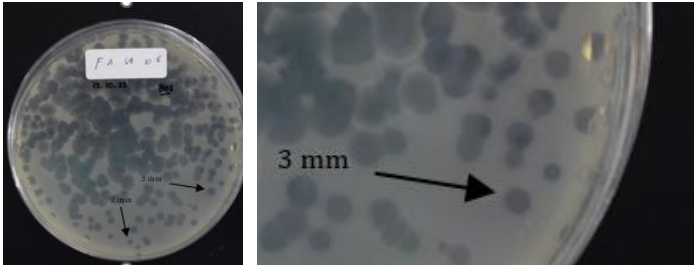
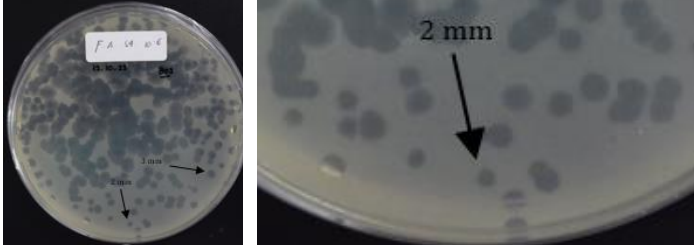
Lampiran Tabel 1. 2 16 plak bakteriofag hasil isolasi yang ditentukan untuk dipurifikasi

No	Kode Sampel	Kode Singkat	Diameter <i>plaque</i>	Gambar	
1	F.A.S1.10 ⁻⁶	S1	1 mm		
2	F.A.S1.10 ⁻⁶	S2	3 mm		

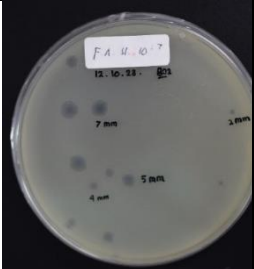

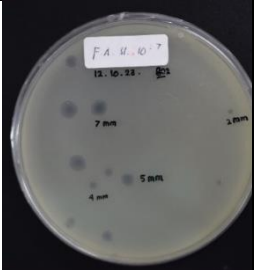

Lampiran Tabel 1. 3 Lanjutan

No	Kode Sampel	Kode Singkat	Diameter plaque	Gambar
3	F.A.S3.10 ⁻⁶	S3	5 mm	
4	F.A.S3.10 ⁻⁶	S4	8 mm	

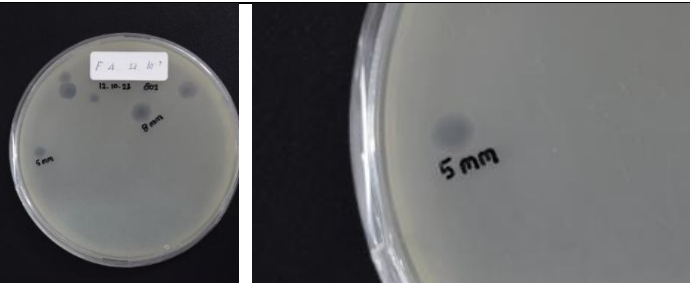
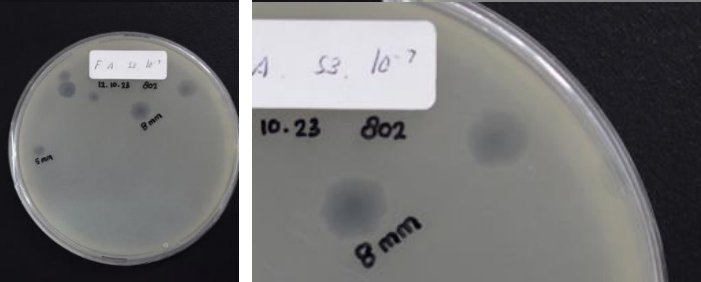
Lampiran Tabel 1. 4 Lanjutan

No	Kode Sampel	Kode Singkat	Diameter plaque	Gambar
5	F.A.S4.10 ⁻⁶	S5	3 mm	
6	F.A.S4.10 ⁻⁶	S6	2 mm	

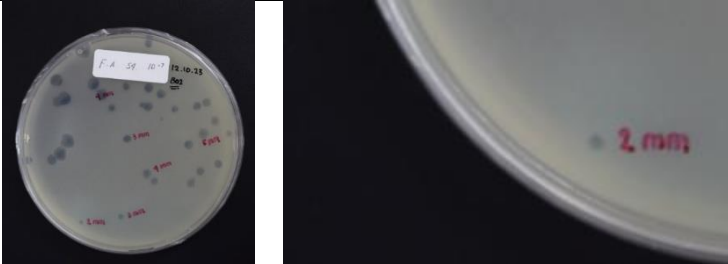

Lampiran Tabel 1. 5 Lanjutan

No	Kode Sampel	Kode Singkat	Ukuran plaque	Gambar	
7	F.A.S1.10 ⁻⁷	S7	7 mm		
8	F.A.S1.10 ⁻⁷	S8	4 mm		

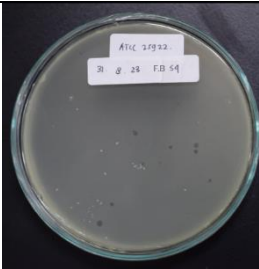
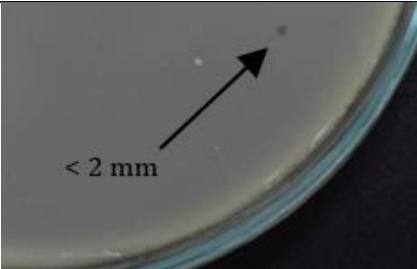
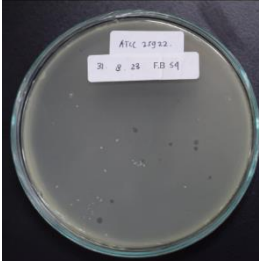
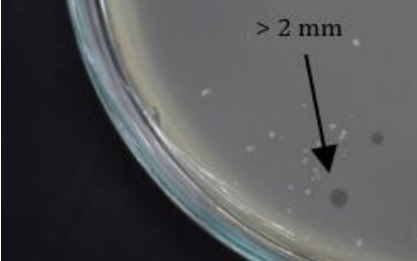
Lampiran Tabel 1. 6 Lanjutan

No	Kode Sampel	Kode Singkat	Ukuran plaque	Gambar
9	F.A.S3.10 ⁻⁷	S9	5 mm	
10	F.A.S3.10 ⁻⁷	S10	8 mm	

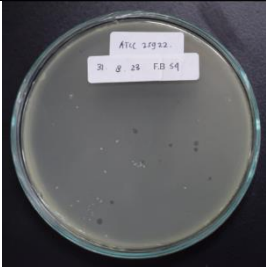
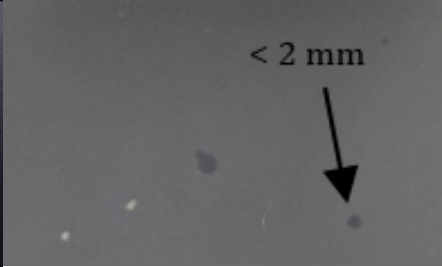
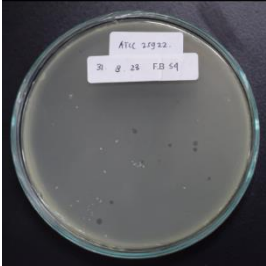
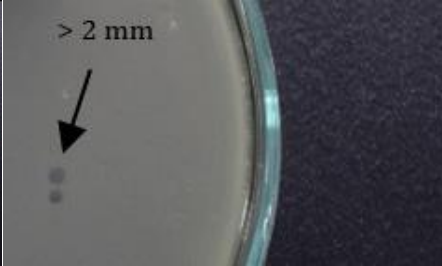
Lampiran Tabel 1. 7 Lanjutan

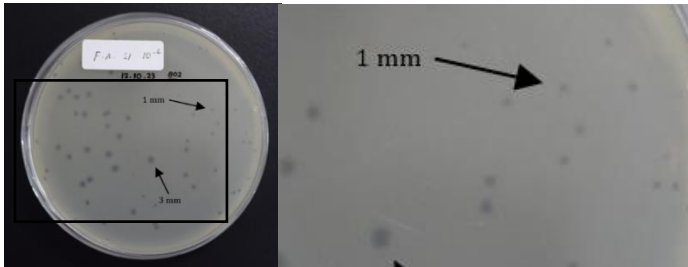
No	Kode Sampel	Kode Singkat	Ukuran <i>plaque</i>	Gambar
11	F.A.S4.10 ⁻⁷	S11	2 mm	
12	F.A.S4.10 ⁻⁷	S12	5 mm	

Lampiran Tabel 1. 8 Lanjutan

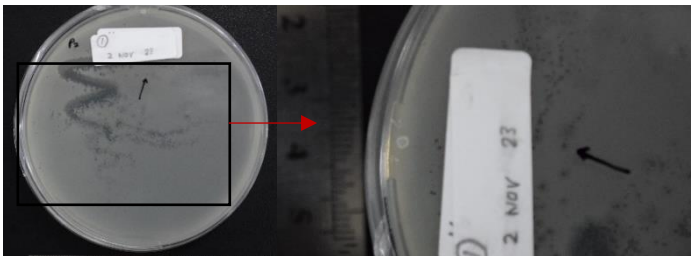
No	Kode Sampel	Kode Singkat	Ukuran plaque	Gambar	
13	F.B.S4.1	S13	< 2 mm		
14	F.B.S4.2	S14	> 2 mm		

Lampiran Tabel 1.9 Lanjutan

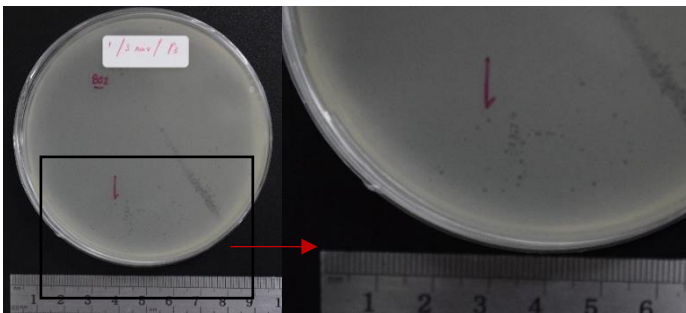
No	Kode Sampel	Kode Singkat	Ukuran plaque	Gambar	
15	A.S4.3	S13	< 2 mm		
16	A.S4.4	S14	> 2 mm		



Purifikasi ke 1

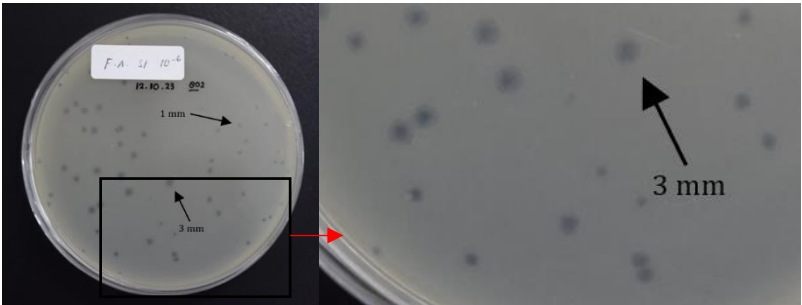


Purifikasi ke 2

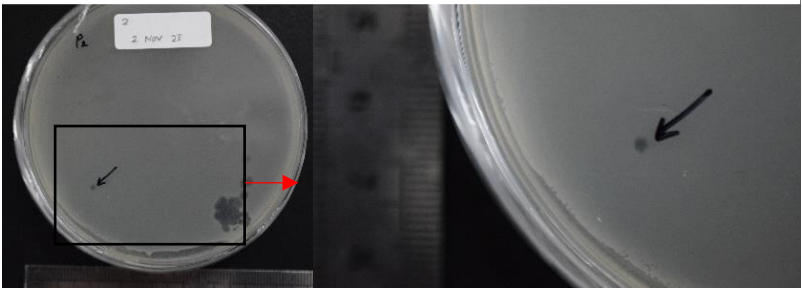


Purifikasi ke 3

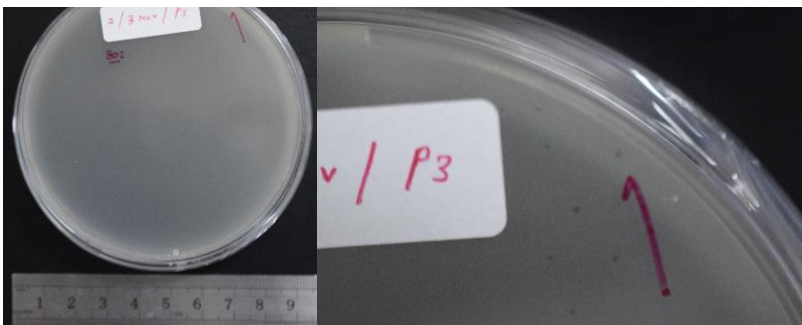
Lampiran Gambar 1. 3 Hasil purifikasi sampel fag S1



Purifikasi ke 1

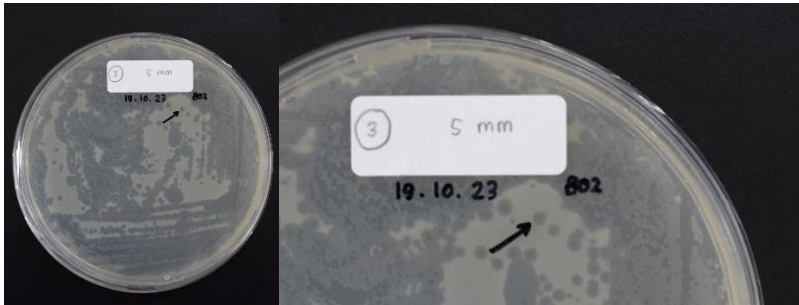


Purifikasi ke 2

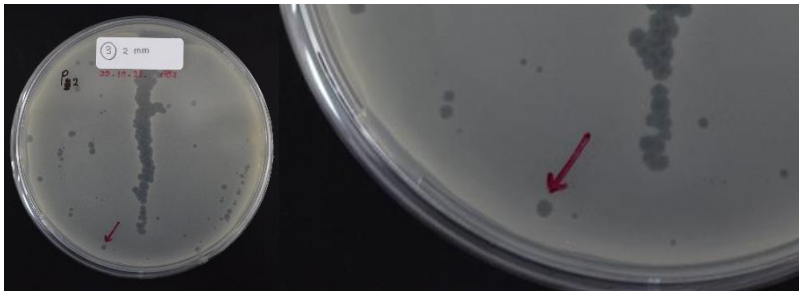


Purifikasi ke 3

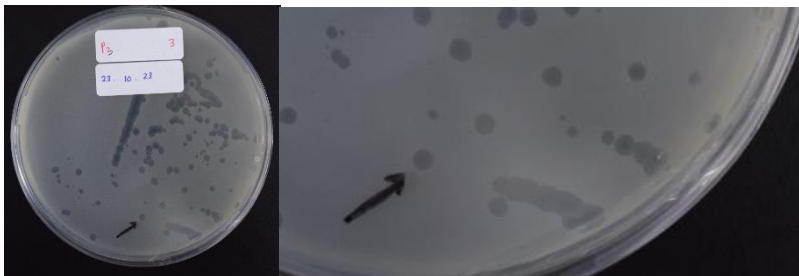
Lampiran Gambar 1. 4 Hasil purifikasi fag S2



Purifikasi ke 1

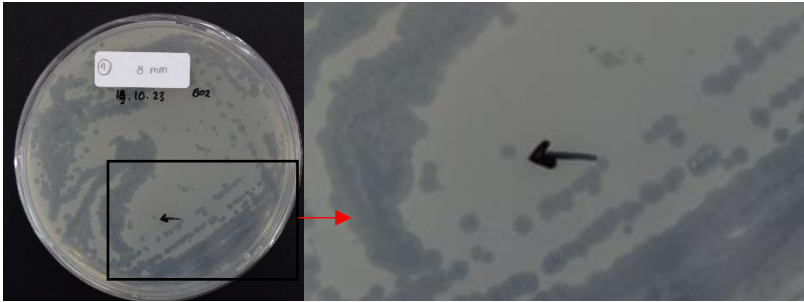


Purifikasi ke 2

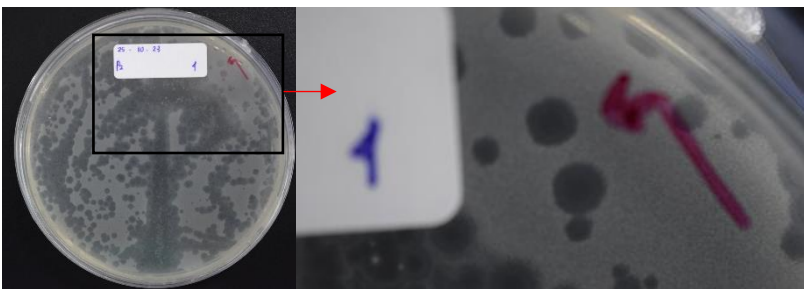


Purifikasi ke 3

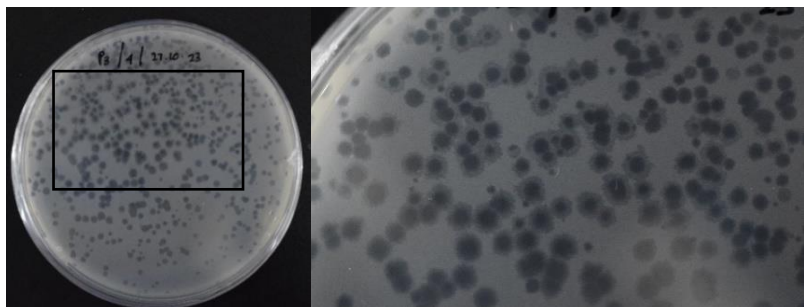
Lampiran Gambar 1. 5 Hasil purifikasi sampel fag S3



Purifikasi ke 1

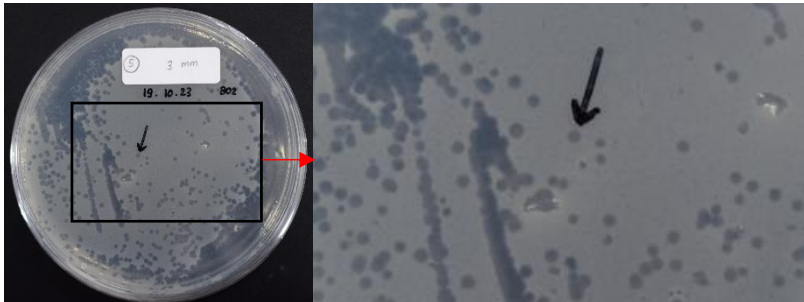


Purifikasi ke 2

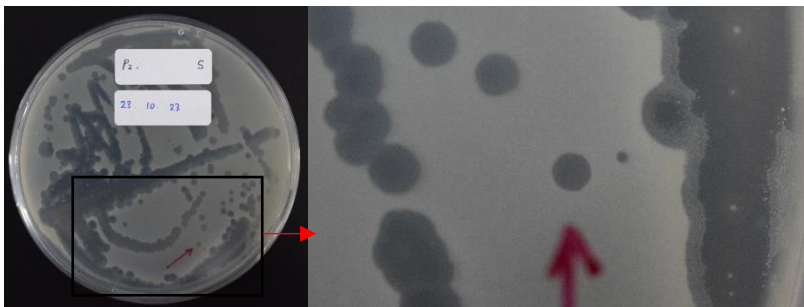


Purifikasi ke 3

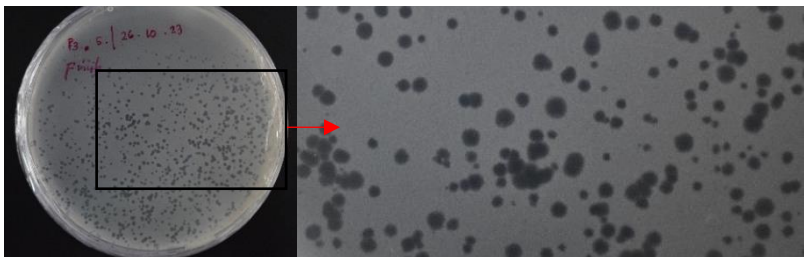
Lampiran Gambar 1. 6 Hasil purifikasi sampel fag S4



Purifikasi ke 1

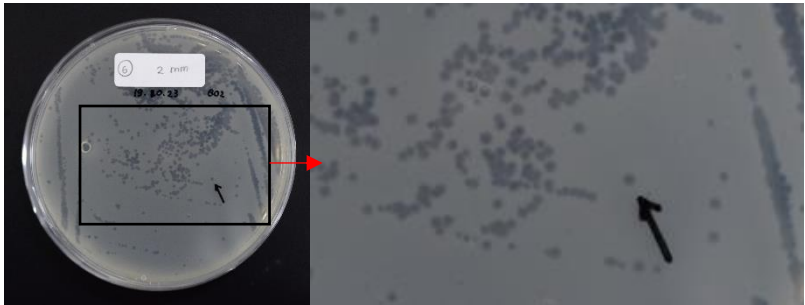


Purifikasi ke 2

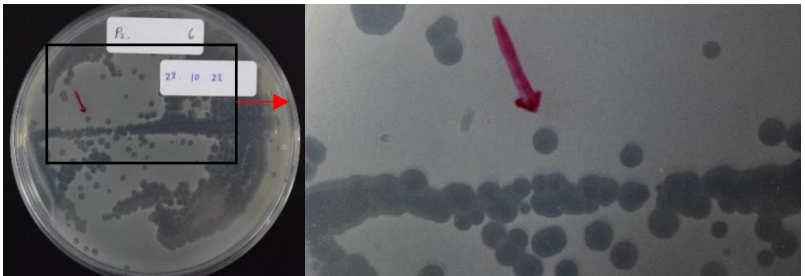


Purifikasi ke 3

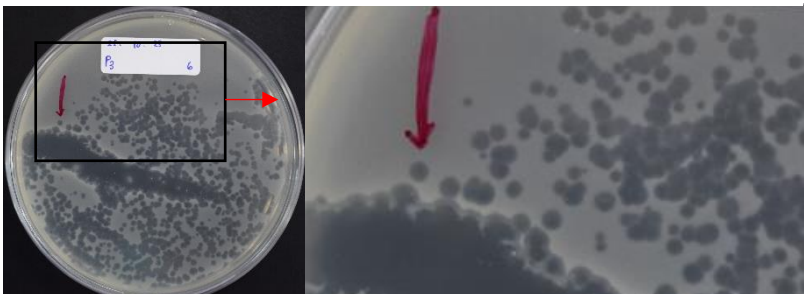
Lampiran Gambar 1. 7 Hasil purifikasi sampel fag S5



Purifikasi ke 1



Purifikasi ke 2

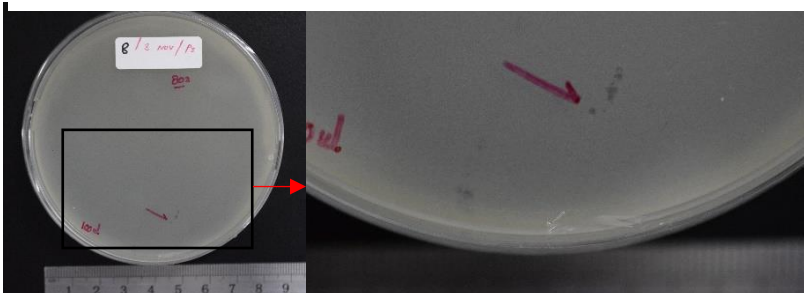


Purifikasi ke 3

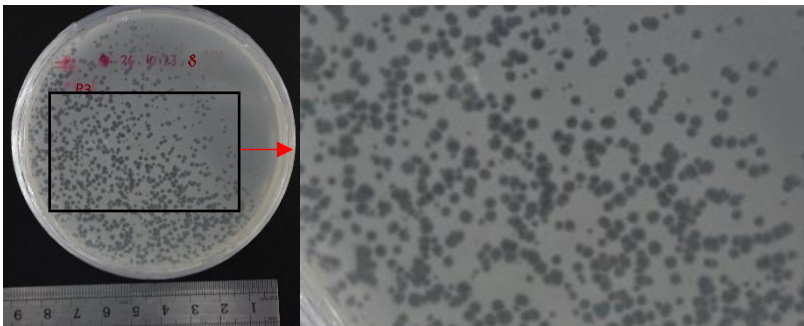
Lampiran Gambar 1. 8 Hasil purifikasi sampel fag S6



Purifikasi ke 1

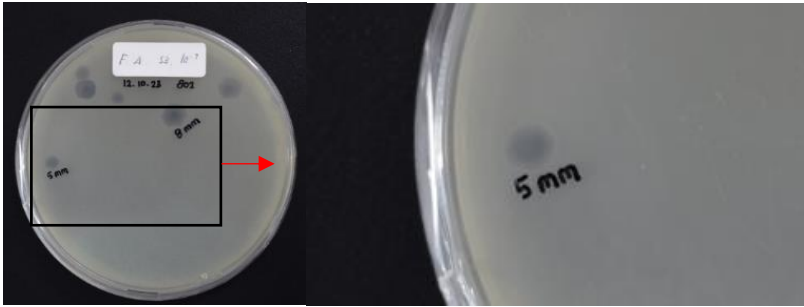


Purifikasi ke 2

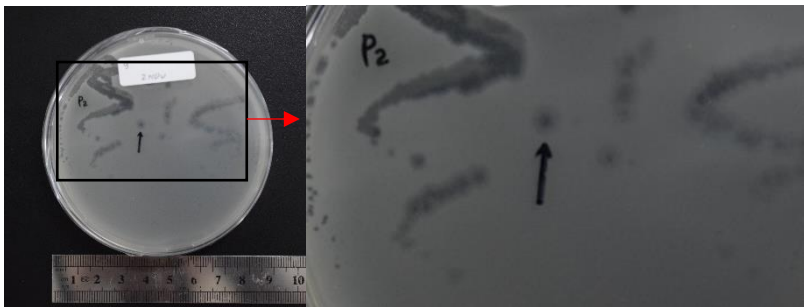


Purifikasi ke 3

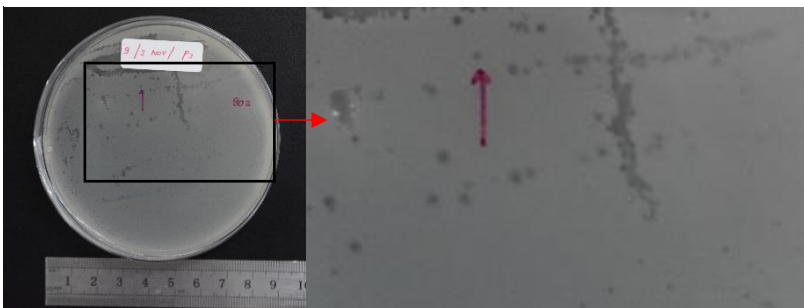
Lampiran Gambar 1. 9 Hasil purifikasi sampel fag S8



Purifikasi ke 1

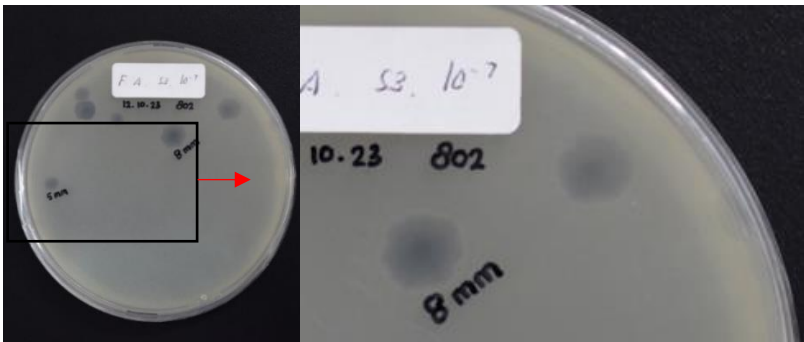


Purifikasi ke 2



Purifikasi ke 3

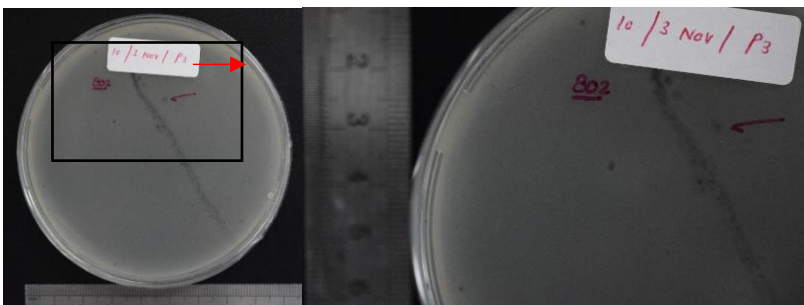
Lampiran Gambar 1. 10 Hasil purifikasi sampel fag S9



Purifikasi ke 1

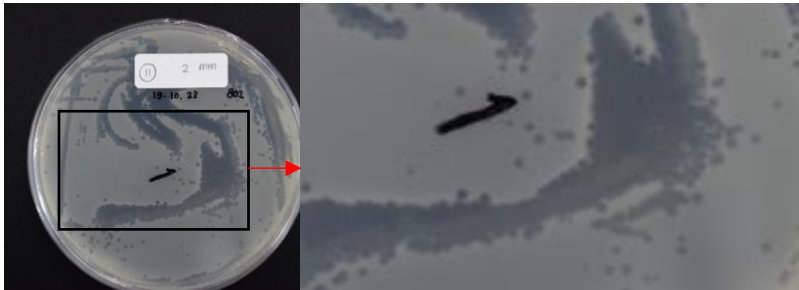


Purifikasi ke 2

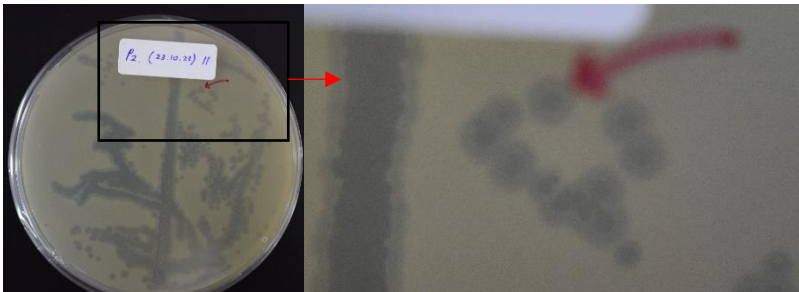


Purifikasi ke 3

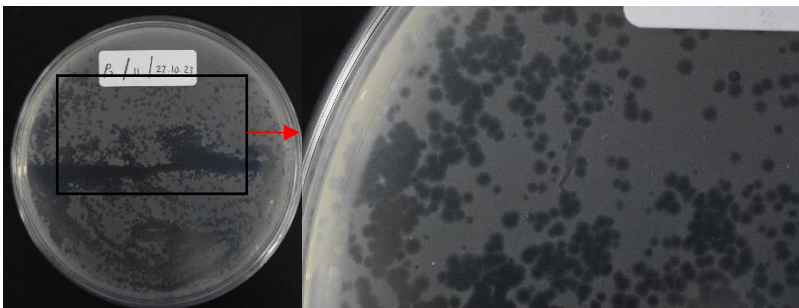
Lampiran Gambar 1. 11 Hasil purifikasi sampel fag S10



Purifikasi ke 1

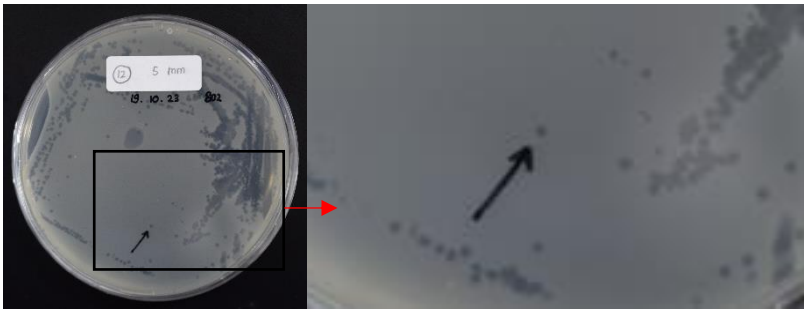


Purifikasi ke 2

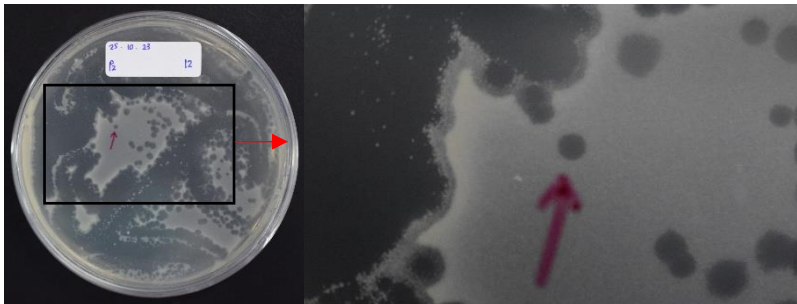


Purifikasi ke 3

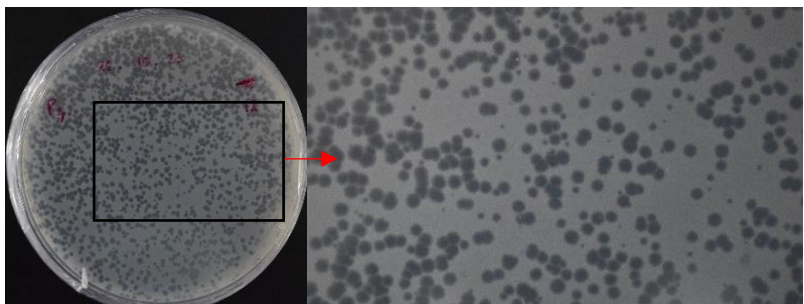
Lampiran Gambar 1. 12 Hasil purifikasi sampel fag S11



Purifikasi ke 1

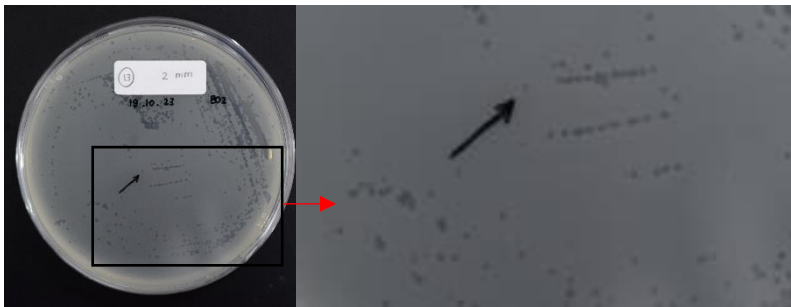


Purifikasi ke 2

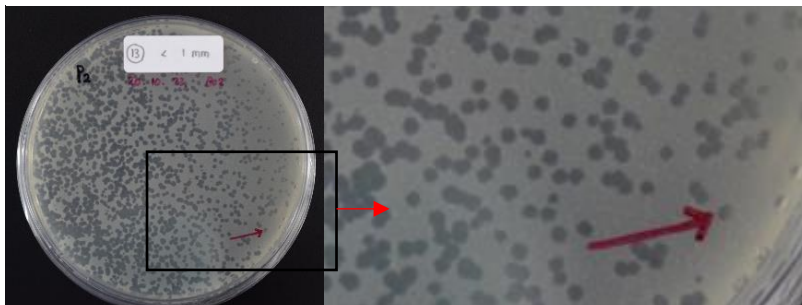


Purifikasi ke 3

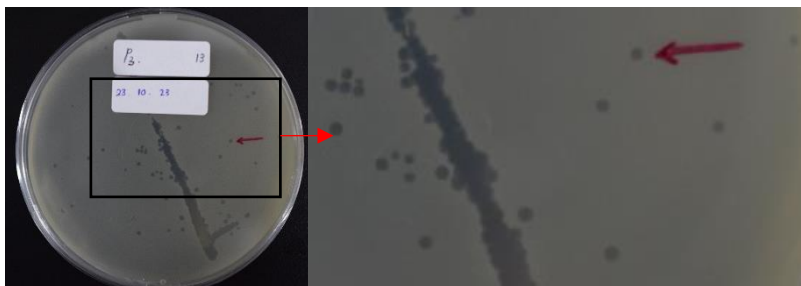
Lampiran Gambar 5. 1 Hasil purifikasi fag S12



Purifikasi ke 1

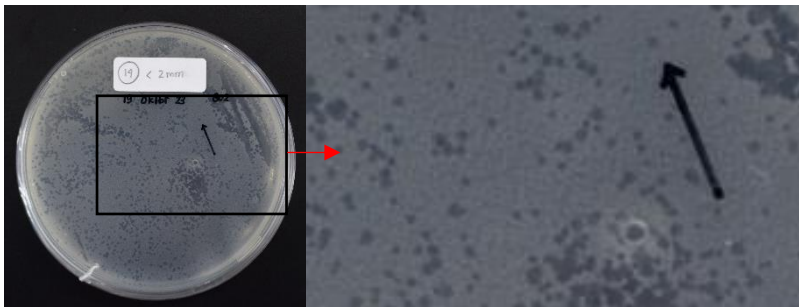


Purifikasi ke 2

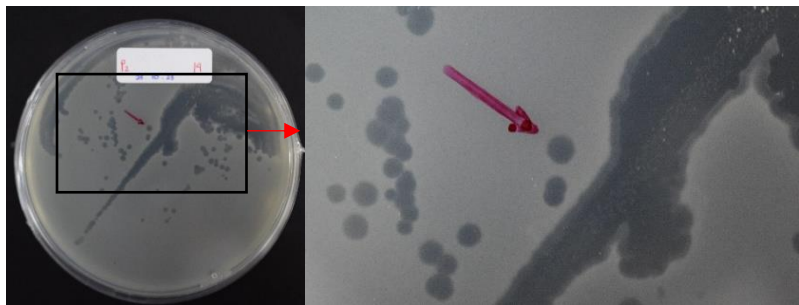


Purifikasi ke 3

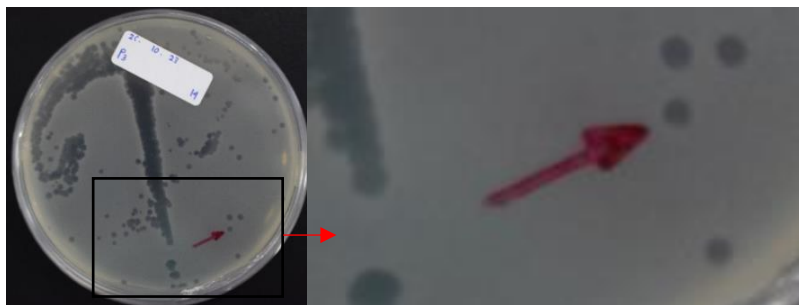
Lampiran Gambar 1. 13 Hasil purifikasi sampel fag S13



Purifikasi ke 1

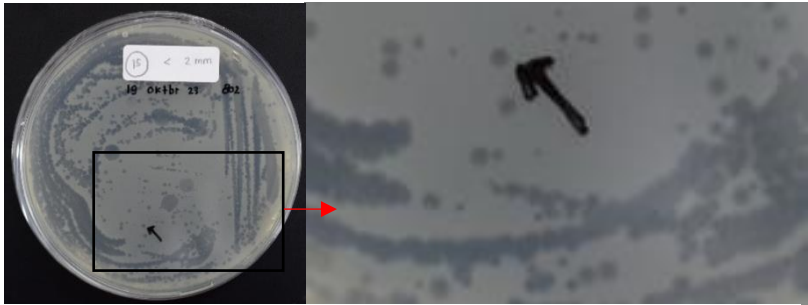


Purifikasi ke 2

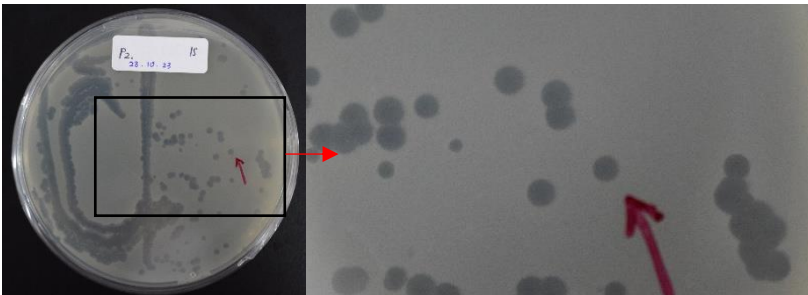


Purifikasi ke 3

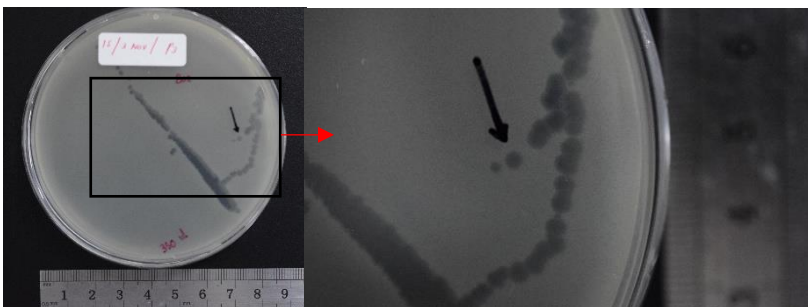
Lampiran Gambar 1. 14 Hasil purifikasi sampel fag S14



Purifikasi ke 1

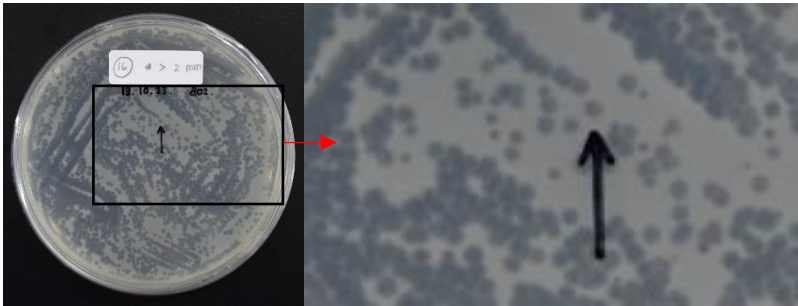


Purifikasi ke 2

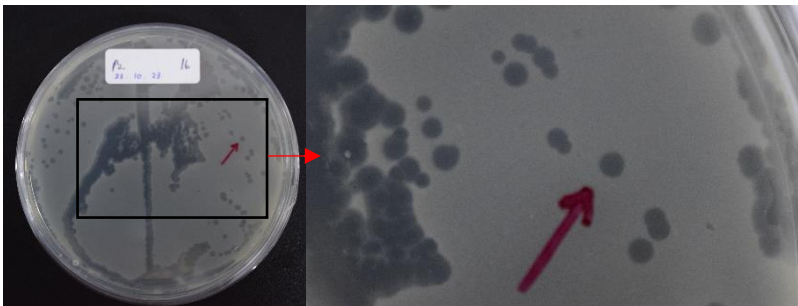


Purifikasi ke 3

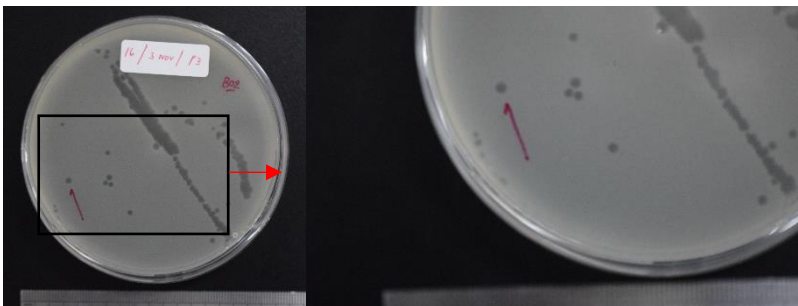
Lampiran Gambar 1. 15 Hasil purifikasi sampel fag S15



Purifikasi ke 1



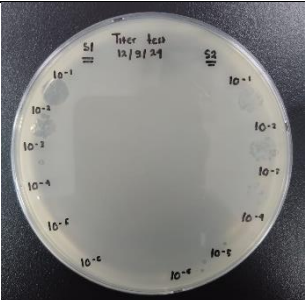


Purifikasi ke 2






Purifikasi ke 3

Lampiran Gambar 1. 16 Hasil purifikasi sampel fag S16

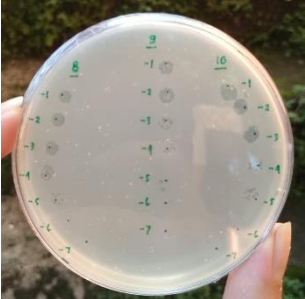
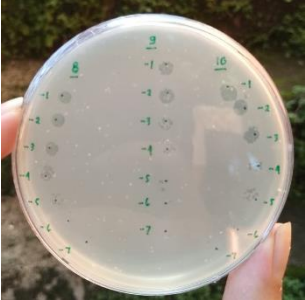
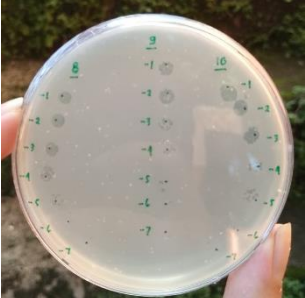
Lampira Tabel 1. 10 Hasil uji *spot titer* fag

Sampel	Gambar	PFU/mL
S1	 <p>A spot titer plate for sample S1. The plate is labeled 'Titer fag 12/9/24' and 'S1' at the top. It shows a confluent lawn of phages at the 10⁻¹ and 10⁻² dilutions, and no visible plaques at higher dilutions (10⁻³ to 10⁻⁸).</p>	1X10 ⁵
S2	 <p>A spot titer plate for sample S2. The plate is labeled 'Titer fag 12/9/24' and 'S2' at the top. It shows a confluent lawn of phages at the 10⁻¹ and 10⁻² dilutions, and no visible plaques at higher dilutions (10⁻³ to 10⁻⁸).</p>	1X10 ⁵
S3	 <p>A spot titer plate for sample S3. The plate is labeled 'S3' at the top. It shows a confluent lawn of phages at the 10⁻¹ and 10⁻² dilutions, and visible plaques at higher dilutions (10⁻³ to 10⁻⁸).</p>	1X10 ⁸




Lampiran Tabel 1. 11 Lanjutan

Bakteriofag	Gambar hasil	PFU/mL
S4		1×10^7
S5		1×10^9
S6		1×10^{10}


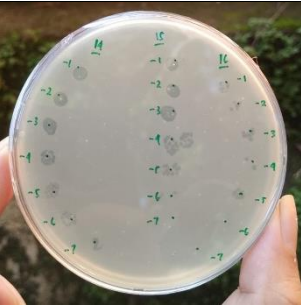
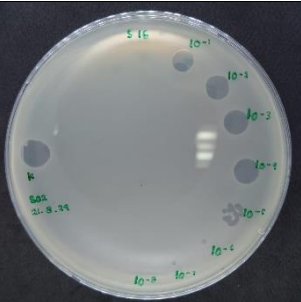
Lampiran Tabel 1. 12 Lanjutan

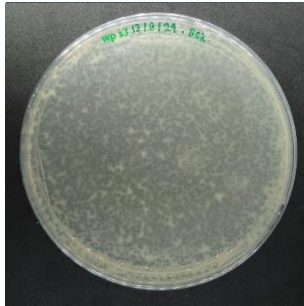
Bakteriofag	Gambar hasil	PFU/mL
S8		1×10^8
S9		1×10^5
S10		1×10^8

Lampiran Tabel 1. 13 Lanjutan

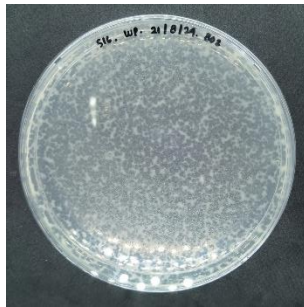
Bakteriofag	Gambar hasil	PFU/mL
S11		1X10 ⁹
S12		1X10 ⁵
S13		1X10 ⁹

Lampiran Tabel 1. 14 Lanjutan

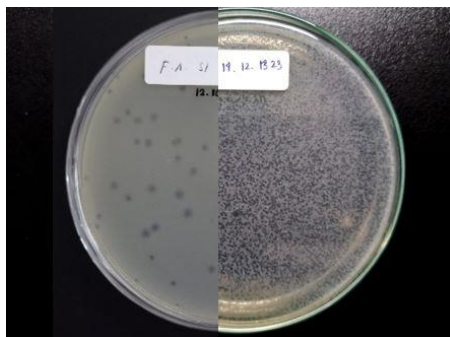
Bakteriofag	Gambar hasil	PFU/mL
S14		1X10 ¹⁰
S15		1X10 ⁸
S16		1X10 ⁸



Lampiran Gambar 1. 17 *Webbed plate* sampel fag S3



Lampiran Gambar 1. 18 *Webbed plate* sampel fag S16



Lampiran Gambar 1. 19
Perbandingan sampel fag hasil isolasi
(a) dan hasil *webbed plate*(b)

Lampiran Tabel 1. 15 Hasil pengukuran nilai absorbansi OD₆₀₀ dengan pengukuran jumlah sel bakteri *E. coli* ATCC 25922 (CFU/mL)

No	Pengenceran (v/v)	Absorban (OD)	Jumlah sel bakteri (CFU/mL)	Log jumlah sel bakteri (CFU/mL)
1	1:0	0,1936	$1,2 \times 10^9$	9,08
2	1:1	0,1164	$4,4 \times 10^8$	8,64
3	1:2	0,0959	$3,8 \times 10^8$	8,58
4	1:3	0,0814	$3,5 \times 10^8$	8,54
5	1:4	0,0728	$2,5 \times 10^8$	8,4

Lampiran Tabel 1. 16 Hasl uji *one step growth* fag S3 (1×10^6 PFU/mL)

<i>Time (min)</i>	Flask A	<i>Plaque numbers (flask A)</i>	Flask B	<i>Plaque numbers (flask B)</i>	Flask C	<i>Plaque numbers (flask C)</i>
5	177	1770				
10	179	1790				
20	277	2770	48	4800		
30	TBUD		55	5500		
40	TBUD		80	80000		
50	TBUD		115	11500		
60	TBUD		124	12400	11	11000
70			132	13200	15	15000
80			143	14300	19	19000
90			290	29000	30	30000
100					47	47000
110					96	96000
120					100	100000

Kontrol absorpsi fag (KAF) =125 plak fag =1250 plak fag

Burst size fag S13

Average 1	Average 2
1770	96000
1790	100000
4800	
5500	
8000	
11500	
12400	
13200	
14300	
Mean = 8140	Mean = 98000
- KAF = 6890	- KAF = 96750

Burst size = Average 2 / Average 1

Burst size = 96750/6890

Burst size = 14,04209

Lampiran Tabel 1. 17 Hasil uji one step growth fag S16 (1×10^5 PFU/mL)

<i>Time (min)</i>	<i>Plaque numbers (flask A)</i>	<i>PFU/mL</i>	<i>Plaque numbers (flask B)</i>	<i>PFU/mL</i>	<i>Plaque numbers (flask C)</i>	<i>PFU/mL</i>
5	10	100				
10	12	120				
15	15	150				
25	116	1160	19	1900		
30	397	3970	53	5300		
35	TBUD	TBUD	62	6200		
40	TBUD	TBUD	75	7500	1	1000
45			117	11700	7	7000
50			273	27300	32	32000
55			TBUD	TBUD		
60			TBUD	TBUD		
65			TBUD	TBUD	58	58000
70					216	216000
75					221	221000
80					239	239000
85					TBUD	TBUD

Kontrol absorpsi fag (KAF) = 11 Plak = 110 plak fag

Burst size fag S16

<i>Average 1</i>	<i>Average 2</i>
100	216000
120	221000
150	239000
1900	
5300	
6200	
7500	
11700	
<i>Mean = 4121,25</i>	<i>Mean = 225333,3333</i>
<i>- KAF = 4.011,25</i>	<i>- KAF = 225.223,30</i>

Burst size = Average 2 / Average 1

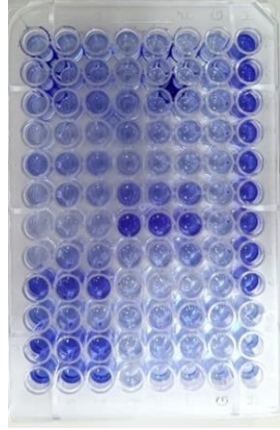
Lampiran Tabel 1. 18 Hasil uji pembentukan biofilm *E. coli* ATCC 25922

Bakteri Uji	Perlakuan	Nilai OD ₆₀₀			Rata-rata	Standar defiasi	3 x SD
		I	II	III			
<i>E. coli</i>	K(-)	0,1527	0,1531	0,1532	0,153	0,000265	0,000794
	<i>E. coli</i>	0,725	0,6817	0,6471	0,6846		

OD cut off	x 1	x 2	x 4
	0,153794	0,307587	0,615175
OD <i>E. coli</i>	0,530806		

Lampiran Tabel 1. 19 Peta Perlakuan pada uji inhibisi biofilm *E. coli* oleh bakteriofag di *Microplate Assay*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		K+	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10	S11
C												
D												
E	S12	S13	S14	S15	S16							
F												
G		K -										



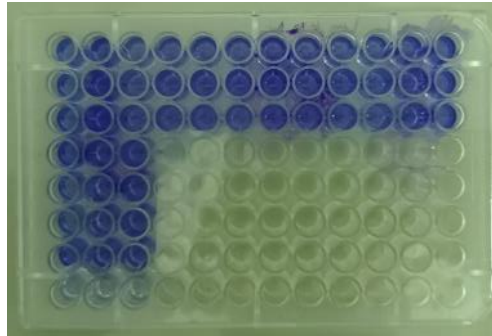
Gambar lampiran 1. 20 Hasil uji inhibisi biofilm *E. coli* ATCC 25922 pada *microplate assay* 96 wells

Lampiran Tabel 1. 20 Hasil perhitungan uji inhibisi biofilm *E. coli* ATCC 25922

Bakteri Uji	Perlakuan	PFU/mL	MOI	Nilai OD			Rata-rata	Standar deviasi	%Penghambatan
				I	II	III			
	K(-)			0,1524	0,1525	0,1511	0,152	0,00078	
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ($7,47 \times 10^8$ CFU/ML)	K(+)			1,4497	1,531	1,3513	1,444	0,08999	
	Fag S1	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,6727	0,5444	0,2948	0,50397	0,19217	72,83%
	Fag S3	1×10^4	1.34×10^{-5}	1,2169	1,3361	1,238	1,26367	0,06361	13,96%
	Fag S4	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,226	0,4237	0,3225	0,324	0,0988	86,68%
	Fag S5	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,198	0,275	0,25	0,241	0,03928	93,09%
	Fag S6	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,2903	0,4409	0,3473	0,3595	0,07604	83,94%
	Fag S8	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,5391	0,4517	0,4515	0,48077	0,05052	74,55%
	Fag S9	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,2534	0,2679	0,2638	0,2617	0,00747	91,51%
	Fag S10	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,369	0,4854	0,5644	0,47293	0,09829	75,16%
	Fag S11	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,3074	0,3794	0,4451	0,3773	0,06887	82,56%
	Fag S12	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,2904	0,3347	0,3382	0,3211	0,02664	86,91%
	Fag S13	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,2311	0,3596	0,2957	0,29547	0,06425	88,90%
	Fag S14	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,3111	0,4058	0,4329	0,38327	0,06395	82,00%
	Fag S15	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,3483	0,4221	0,6089	0,45977	0,13432	76,36%
Fag S16	1×10^4	1.34×10^{-5}	0,2416	0,2272	0,247	0,2386	0,01024	93,30%	

Lampiran Tabel 1. 21 Peta sebaran perlakuan pada uji eradikasi biofilm *E. coli* ATCC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B	S1		S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10	S11	S12	S13	
C													
D													
E	S14	S15	S16										
F													
G	K(+)												
H	K(-)												



Lampiran Gambar 1. 21 Hasil uji eradikasi biofilm *E. coli* ATCC 25922 pada *microplate assay* 96 wells

Lampiran Tabel 1. 22 Hasil perhitungan uji eradikasi biofilm *E. coli* ATCC 25922

Bakteri Uji	Perlakuan	PFU/mL	MOI	Nilai OD			Rata-rata	Standar deviasi	%Penghancuran
				I	II	III			
	K(-)			0,1225	0,1304	0,1327	0,128533	0,00535	
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (5,5 x 10 ⁸ CFU/mL)	K(+)			0,5651	0,5976	0,5697	0,577467	0,017587	
	Fag S1	1 X 10 ⁴	1.818×10 ⁻⁵	0,4701	0,4575	0,4811	0,469567	0,011809	24,05%
	Fag S3	1 X 10 ⁸	0.1818	0,3664	0,4072	0,4229	0,398833	0,029164	39,80%
	Fag S4	1 X 10 ⁹	1.818	0,4624	0,48	0,4484	0,4636	0,015834	25,3%.
	Fag S5	1 X 10 ⁵	1.818×10 ⁻⁴	0,4548	0,5102	0,5055	0,490167	0,030718	19,40%
	Fag S6	1 X 10 ⁸	0.1818.	0,4246	0,4812	0,4213	0,442367	0,033671	30,10%
	Fag S8	1 X 10 ⁷	1.818×10 ⁻²	0,5294	0,5173	0,5297	0,525467	0,007074	11,58%
	Fag S9	1 X 10 ⁶	1.818×10 ⁻³	0,4389	0,4037	0,479	0,440533	0,037677	30,50%
	Fag S10	1 X 10 ⁷	1.818×10 ⁻²	0,4323	0,4586	0,499	0,4633	0,033597	25,40%
	Fag S11	1 X 10 ⁹	1.818	0,4084	0,3989	0,409	0,405433	0,005666	38,30%
	Fag S12	1 X 10 ⁷	1.818×10 ⁻²	0,4699	0,4863	0,5199	0,492033	0,025488	19,00%
	Fag S13	1 X 10 ⁵	1.818×10 ⁻⁴	0,5853	0,5375	0,5388	0,553867	0,02723	5,26%
	Fag S14	1 X 10 ⁷	1.818×10 ⁻²	0,38	0,41	0,4433	0,4111	0,031664	37,1%.
	Fag S15	1 X 10 ⁴	1.818×10 ⁻⁵	0,4576	0,5221	0,4918	0,4905	0,03227	19,3%.
Fag S16	1 X 10 ⁶	1.818×10 ⁻³	0,4801	0,5223	0,5216	0,508	0,024165	15,47%.	

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

Nama : Anton Tubagus Satrio
Tempat, Tanggal Lahir : Cianjur, 26 Desember 2001
Alamat : RT. 11, RW. 6, Blok Kebon, Desa Sidamulya, Kecamatan Bongas, Kabupaten Indramayu, Provinsi Jawa Barat, Kode Pos 45255
Hobi : Membaca *E book*, blog *Medium*, *Quora*.
Email : tubaguuus@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

1. Pendidikan Formal:

- a. SDN Sidamulya 4 Bongas, Indramayu
- b. MTs Darul Falah Bongas, Indramayu
- c. MA Ar-Rahmat Majalengka
- d. UIN Walisongo Semarang

2. Pendidikan Non-Formal:

- a. *Islamic Boarding School* Ar-Rahmat Majalengka
- b. Pondok Pesantren Darul Falah Besongo, Semarang
- c. Pondok Pesantren Al-Firdausy, Tugu Rejo, Semarang

C. Pengalaman Organisasi

1. Anggota PSDM HMJ Biologi UIN Walisongo Semarang (2022-2023)

Semarang, 20 Desember 2024

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Anton Tubagus Satrio', written in a cursive style.

Anton Tubagus Satrio

NIM. 2008016001

