

Uji Aktivitas Antibakteri Bakteriofaga HK terhadap *Escherichia coli* O157H7 sebagai Agen Penyebab *Foodborne Disease*

(Antibacterial Activity Test of HK Bacteriophage against *Escherichia coli* O157H7 as a Causative Agent for Foodborne Disease)

Ariyanti T¹, Rachmawati F¹, Gunarso DN²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor

²Mahasiswa Universitas Pancasila, Jakarta

tatiariyanti03@gmail.com

ABSTRACT

Foodborne diseases are diseases in humans caused by consuming food contaminated with pathogenic microbes of animal origin. One of the causes of foodborne illness is *Escherichia coli* (*E. coli*) O157H7. Alternative therapy for pathogenic bacterial infections is to use the HK bacteriophage (phage) isolate as antibacterial. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of HK phages against *E. coli* O157H7. Activation and Activation of HK phages against *E. coli* O157: H7 was carried out by calculating the concentration of HK phases with the Double Layer Agar (DLA) method, testing of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Killing Concentration (MKC) and calculation of Multiplicity of Infection (MOI). In this study, the MIC value of the HK phages were 6.35×10^2 (PFU)/ml and the MKC value of the HK phages were 6.35×10^3 PFU/ml while the MOI value of the HK phages was 0.9621×10^{-6} PFU/CFU. HK phage has activity as an antibacterial against *E. coli* O157: H7.

Key words: Bacteriophage, HK, *Escherichia coli* O157H7, antibacteria, MOI

ABSTRAK

Foodborne disease adalah penyakit pada manusia akibat mengonsumsi makanan yang tercemar mikroba patogen asal hewan. Salah satu penyebab *foodborne disease* adalah *Escherichia coli* (*E. coli*) O157H7. Alternatif terapi terhadap infeksi bakteri patogen adalah memanfaatkan isolat bakteriofaga (faga) HK sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas antibakteri pada faga HK terhadap *E. coli* O157H7. Aktivasi faga HK terhadap *E. coli* O157:H7 dilakukan melalui perhitungan konsentrasi faga HK dengan teknik *Double Layer Agar* (DLA), uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM), dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) serta perhitungan *Multiplicity of Infection* (MOI). Pada penelitian ini dihasilkan nilai KHM dari faga HK sebesar $6,35 \times 10^2$ PFU/ml dan nilai KBM faga HK sebesar $6,35 \times 10^3$ PFU/ml, sedangkan nilai MOI dari faga HK sebesar $0,9621 \times 10^{-6}$ PFU/CFU. Faga HK memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *E. coli* O157:H7.

Kata kunci: Bakteriofaga, HK, *Escherichia coli* O157H7, antibakteri, MOI

PENDAHULUAN

Foodborne disease merupakan penyakit yang terjadi akibat mengonsumsi makanan yang tercemar bakteri patogen asal hewan. Lebih dari 90% kejadian keracunan makanan pada manusia akibat mengonsumsi makanan yang tercemar oleh bakteri patogen. *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 merupakan salah satu strain *E. coli* yang dikenal sebagai *foodborne pathogen* utama yang sering menyebabkan wabah keracunan pada manusia karena bakteri ini menghasilkan 2 jenis sitotoksin, yaitu toksin Shiga (Stx1 dan Stx2) atau Verotoksin (VT1 dan VT2) (Lee et al. 2013). Dosis infeksi *E. coli* O157:H7 pada manusia dilaporkan 1-100 CFU/mL, dosis ini lebih rendah dari patogen enterik yang lain. Dengan dosis infeksi yang rendah menunjukkan bahwa virulensi bakteri ini sangat potensial sebagai penyebab penyakit (Robinson & McKillip 2010). Meskipun infeksi dapat sembuh sendiri namun bakteri dapat mengancam karena dapat menyebabkan timbulnya *Hemorrhagic Colitis* (HC) dan *Haemolytic Uremic Syndrome* (HUS) pada anak-anak dan penderita dengan imunitas yang lemah. Bahkan pada kondisi yang parah dapat menimbulkan kematian (Kiranmayi et al. 2010).

Resistensi antibiotik mulai dikenal selama akhir 1950-an dan awal 1960-an pada beberapa agen antimikroba, di antaranya adalah bakteri enterik, yaitu *Salmonella*, *Shigella*, dan *Escherichia coli*. Bakteri-bakteri patogen tersebut merupakan penyebab utama terjadinya *foodborne disease*. Pada umumnya, masyarakat menggunakan antibiotik untuk mengatasi masalah keracunan pangan dan membunuh bakteri patogen penyebabnya (Aslam et al. 2018). Akibat yang tidak bisa dihindari dari pemakaian antibiotik yang tidak bijak adalah resistensi bakteri terhadap antibiotik. Krisis resistensi bakteri terhadap antibiotik yang terjadi dapat disebabkan kurangnya edukasi terhadap masyarakat, akses yang mudah untuk memperoleh antibiotik, dan kurangnya pengembangan obat baru oleh industri farmasi. Penggunaan antibiotik secara berlebihan dan tidak sesuai pada pasien mendorong peningkatan pesat prevalensi *multidrug resistant pathogens* (Lee 2015).

Bakteriofaga (faga) adalah virus yang menginfeksi bakteri dan bersifat parasit intraseluler obligat dan faga membutuhkan sel inang atau bakteri untuk bermultiplikasi. Pada awal abad ke-20, Frederick Twort dan Felix d'Herelle menemukan faga yang menyebabkan lisis pada sel bakteri. Sejak ditemukan, faga telah digunakan dalam berbagai aplikasi praktis, termasuk pada manusia dan kedokteran hewan (Paul et al. 2011). Faga terdistribusi luas di seluruh alam dalam substansi, seperti tanah, air, udara, permukaan, laut, air tawar, rhizosphere, tumbuhan, makanan, fermentasi industri, dan di luar maupun di dalam rongga tubuh manusia dan hewan (Ackermann & Prangishvili 2012). Faga merupakan musuh alami dari bakteri dan dapat membunuh bakteri spesifik yang tidak diinginkan tanpa mengganggu mikroflora normal tubuh. Spesifisitas yang

dimiliki faga menjadi alternatif yang dipilih dalam terapi pengobatan *foodborne disease* dan resistensi bakteri terhadap antibiotik ((Kazi & Annapure 2016).

Saat ini, telah ditemukan 3 tipe bakteriofaga isolat Indonesia yang menginfeksi *E. coli* O157H7, yaitu T4, HK, dan Lambda (Ariyanti 2016). Faga HK merupakan anggota dari famili Siphoviridae, yaitu famili bakteriofaga yang mempunyai ciri khas bentuk kepala *icosahedral* dengan jenis materi genetik *linear dsDNA*, dan ekor panjang non kontraktil (Ackermann & Prangishvili 2012; Kazi & Annapure 2016). Faga HK isolat Indonesia ini mempunyai struktur yang sama dengan faga HK97 yang merupakan *temperate coliphage* yang pertama kali diisolasi di Hong Kong. Kemungkinan nama HK berasal dari kata Hong Kong, yaitu lokasi ditemukannya faga HK97 (Popa et al. 1991).

Pemanfaatan faga tipe HK di Indonesia sebagai terapi *foodborne disease* belum dilakukan. Aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh faga HK dapat diketahui melalui beberapa cara. Salah satu teknik yang dapat digunakan adalah dengan teknik dilusi cair untuk menentukan konsentrasi faga terendah yang dapat menghambat (bakteriostatik) dan membunuh (bakteriosidal) pertumbuhan *E. coli* O157H7. Konsentrasi faga terendah yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* O157H7 disebut sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Sedang Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentarsi faga terendah yang mampu membunuh *E. coli* O157:H7 secara sempurna (Cieplak et al. 2018). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri faga HK terhadap *E. coli* O157H7 baik dengan menentukan nilai KHM maupun KBM dan nilai *Multiplicity of Infection* (MOI) dari faga HK.

MATERI DAN METODE

Uji aktivitas bakteriofaga (faga) HK terhadap *E. coli* O157H7 dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu preparasi *E. coli* O157H7 sebagai inang dari faga HK, preparasi faga HK dari stok penyimpanan, menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) faga HK serta menentukan nilai *Multiplicity of Infection* (MOI) faga HK terhadap *E. coli* O157H7.

Preparasi *E. coli* O157H7 sebagai inang dari faga HK

Pada penelitian ini, sebagai inang bakteriofaga HK digunakan isolat *E. coli* O157:H7 ATCC 43984. Isolat tersebut diambil dari stok penyimpanan lalu ditumbuhkan kembali pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri selanjutnya ditumbuhkan pada media agar selektif *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dan *Sorbitol Mac Conkey-Cefixime Tellurite* (SMAC-CT), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Baehaqi et al. 2015). Koloni hijau metalik yang tumbuh pada media EMBA diidentifikasi lebih lanjut dengan uji Indol, *Methyl Red*, *Voges Proskauer*, dan

Simmons Citrate (IMViC), dan uji serologi. Koloni pucat (*colourless*) yang tumbuh pada SMAC-CT langsung dikonfirmasi dengan uji serologi menggunakan antiserum O157 dan antiserum H7 (SNI 2008; Baehaqi et al. 2015).

Tahap uji serologi dilakukan dengan cara meneteskan antiserum O157 dan antiserum H7 pada kaca objek, masing-masing antiserum ditambahkan dengan satu ose *Escherichia coli* O157:H7 dari media SMAC-CT. Sebelum direaksikan dengan masing-masing antiserum, satu ose bakteri dihomogenkan dengan satu tetes NaCl fisiologis. Reaksi positif dari masing-masing antiserum O157 dan H7 terhadap *E. coli* O157:H7 ditandai dengan terbentuknya aglutinasi seperti pasir (Supar 1996).

Isolat *E. coli* O157:H7 ATCC 43984 yang telah ditumbuhkan kembali dari stok penyimpanan dan dikonfirmasi tumbuh murni, selanjutnya disiapkan dalam media *nutrient agar* untuk uji lebih lanjut. Perhitungan jumlah *E. coli* O157H7 pada stok dilakukan untuk mengetahui konsentrasi *E. coli* O157H7 yang telah disimpan beberapa waktu menggunakan teknik Angka Lempeng Total (ALT) dengan satuan hitung koloni disebut *Colony Forming Unit (CFU)* (SNI 2008).

Propagasi faga HK dari stok penyimpanan

Faga HK dari stok penyimpanan ditumbuhkan kembali dengan cara diambil sebanyak 100 µL isolat faga HK ditambah dengan 100 µL biakan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 3 mL media BHIB kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Keesokan harinya disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan difiltrasi menggunakan membran filter berukuran pori 0,22 µm. Supernatan hasil filtrasi (supernatan faga) ditampung dalam botol steril (Viazis et al. 2011; Ariyanti 2016).

Perbanyakkan faga HK dilakukan dengan teknik *Spot Testing* (Mirzaei & Nilsson 2015). Sebanyak 100 µL biakan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dimasukkan ke dalam cawan petri kosong dan steril, kemudian dituangkan ± 10 mL media agar *Brain Heart Infusion* (BHI) ke dalam cawan petri, dihomogenkan dan dibiarkan sampai memadat. Setelah padat, media dibagi 6 dan diberi kode. Tiap kode ditetesi 5 ul supernatan faga dan dibiarkan mengering. Posisi dipertahankan pada tempat yang datar, sehingga spot (tetesan supernatan faga) yang dihasilkan tetap bulat. Setelah mengering, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Keesokan harinya, pada spot yang mengandung faga akan terbentuk plak/daerah bening yang terbentuk dipotong dengan spatula dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 2 ml dapar *Storage Medium* (SM) dan dibiarkan selama 30 menit. Selanjutnya sebanyak 2 ml larutan SM dipindahkan ke dalam tabung ependorf, dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan difiltrasi menggunakan membran filter berukuran pori 0,22 µm. Supernatan hasil filtrasi ditampung sebagai suspensi faga yang siap untuk

diuji, Sebelum diuji supernatan faga disimpan pada suhu 4°C dan dapat dilakukan penghitungan faga menggunakan teknik *Double Layer Agar* (DLA) dan ALT (Viazis et al. 2011; Yıldırım et al. 2018).

Uji pengaruh hambatan infeksi *E. coli* O157:H7 terhadap faga HK dilakukan dengan cara menyiapkan 10 tabung suspensi *E. coli* O157:H7 dalam kaldu BHIB umur 24 jam, yang telah ditambahkan faga HK dengan konsentrasi bertingkat, dari 1×10^1 *Plaque Forming Unit* (PFU)/ml sampai dengan 1×10^{10} PFU/ml. Pengamatan dilakukan terhadap aktivitas faga dalam membunuh pertumbuhan *E. coli* O157:H7. Hasil pengamatan dibandingkan dengan tabung blanko berupa larutan BHIB (bening) dan tabung kontrol negatif berupa suspensi *E. coli* O157:H7 (keruh). Keberadaan faga dalam tabung-tabung uji dikonfirmasi dengan menumbuhkan kembali faga pada media *double layer* BHI agar dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan faga ditandai dengan terbentuknya plak/zona bening pada media BHI agar (Dallal et al. 2016).

Menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) faga HK

Penentuan KHM dengan teknik dilusi cair bertujuan untuk melihat aktivitas bakteriostatik faga HK terhadap *E. coli* O157:H7. Prinsip teknik dilusi cair adalah untuk mengencerkan faga HK hingga didapat suatu variasi konsentrasi yang kemudian masing-masing konsentrasi tersebut ditambahkan dengan suspensi bakteri. Nilai KHM ditentukan berdasarkan kadar terendah larutan uji yang menghasilkan larutan yang jernih setelah dilakukan inkubasi (Vipra et al. 2013). Pada preparasi seri pengenceran larutan faga, disiapkan sebanyak 12 tabung reaksi steril. Pada tabung 1-10 dibuat pengenceran berseri, dengan larutan pengencer 2,7 ml BHIB. Pada tabung pertama ditambahkan 0,3 ml supernatan faga HK, dihomogenkan dengan vortex dan menjadi konsentrasi 10^1 kemudian larutan dipipet 0,3 ml dari tabung pertama ke tabung kedua dan dihomogenkan, dilakukan berulang sampai tabung ke-10. Pada masing-masing tabung (1-10) ditambahkan sebanyak 1 ml suspensi *E. coli* O157:H7 ATCC 43984, dicampur sampai homogen. Tabung ke-11 sebagai kontrol positif yang berisi 3 ml larutan media BHIB (tampak bening) dan tabung ke-12 sebagai kontrol negatif berisi 2 ml larutan media BHIB ditambah dengan 1 ml suspensi *E. coli* O157:H7 ATCC 43984 (tampak keruh). Semua tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nilai KHM ditentukan dengan mengamati tabung yang berisi konsentrasi faga HK terendah yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* O157:H7 ATCC 43984. Pengamatan adanya aktivitas faga HK dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* O157:H7, pada tabung tersebut ditandai dengan terbentuknya larutan bening (Dallal et al. 2016).

Menentukan konsentrasi bunuh minimal (KBM) faga HK

Penentuan KBM dilakukan dengan cara mengamati tabung-tabung KHM setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C terhadap tingkat kekeruhannya. Tabung KHM yang mengandung kadar terendah tetapi masih mampu menghambat bakteri (larutan jernih) selanjutnya ditanam pada media EMBA dengan cara digores untuk melihat pada konsentrasi terendah yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada media agar. Pengamatan KBM disertai dengan kontrol negatif dan kontrol positif (Dallal et al. 2016).

Menentukan *Multiplicity of Infection* (MOI) faga HK terhadap *E. coli* O157H7

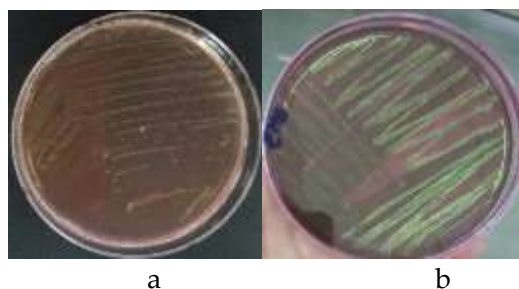
Multiplicity of Infection (MOI) adalah rasio dari perlekatan/agen yang menginfeksi pada target yang sesuai yang dirumuskan sebagai jumlah plak dari faga yang digunakan untuk menginfeksi/jumlah sel bakteri (Abedon 2016). Tahap ini dilakukan untuk menentukan *host range* dari faga HK terhadap *E. coli* O157:H7. Jika mendapatkan nilai <10 dikategorikan sebagai sel inang (*E. coli* O157H7) rentan terhadap faga atau *propagating range* (PR) dalam hal ini dikatakan bahwa faga dapat memperbanyak diri (*auto dosing*) agar dapat melisis sel bakteri inang. Jika mendapatkan nilai 100-1000 dikategorikan sebagai sel inang tersebut dapat diabsorpsi oleh faga tetapi tidak rentan atau *killing range* (KR) dalam hal ini dikatakan bahwa ketika faga menyerang sel inang, faga tersebut langsung menyerang sel inang dan tidak selektif dalam kondisi konsentrasi faga yang tetap. Jika mendapatkan nilai >100 dikategorikan sel bakteri resisten terhadap faga. Hasil yang didapatkan dari KHM faga HK dan perhitungan jumlah bakteri dengan teknik ALT dimasukkan ke dalam rumus untuk menentukan nilai MOI dari faga HK terhadap *Escherichia coli* O157:H7 (Vipra et al. 2013).

$$\text{MOI} = \frac{\text{volume faga yang ditambahkan} \times \text{konsentrasi faga}}{\text{volume bakteri yang ditambahkan} \times \text{jumlah sel bakteri}} = \frac{\text{ml} \times \text{PFU/ml}}{\text{ml} \times \text{CFU/ml}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi *E. coli* O157H7 sebagai inang dari faga HK

E. coli O157:H7 ATCC 43984 sebagai inang faga HK, tumbuh baik pada media EMBA berupa koloni berwarna hijau metalik (Gambar 1a) dan koloni pucat/ tidak berwarna/*colourless* pada media SMAC-CT (Gambar 1b). Konfirmasi *serotyping* menunjukkan bahwa isolat *E. coli* O157:H7 ATCC 43984 masih bereaksi positif terhadap antiserum O157 maupun antiserum H7.



Gambar 1. Pertumbuhan *E. coli* O157H7 pada media EMBA dan SMAC-CT

Penghitungan terhadap konsentrasi *E. coli* O157:H7 yang terdapat dalam suspensi bakteri umur 24 jam dengan teknik ALT diperoleh hasil sebesar $6,6 \times 10^9$ CFU/ml. Jumlah bakteri ini selanjutnya akan digunakan untuk perhitungan jumlah plak faga, KHM, KBM, dan MOI.

Propagasi stok isolat dan perbanyak faga HK dengan *Spot Testing*

Hasil propagasi faga HK menunjukkan bahwa stok faga HK dari penyimpanan masih dapat tumbuh murni dan mampu menginfeksi *E. coli* O157:H7 ATCC 43984. Kemampuan faga HK dalam melisis *E. coli* O157:H7 ATCC 43984 pada media agar BHI dapat diamati pada Gambar 2. Pertumbuhan faga HK tersebut ditunjukkan dengan daerah bening pada titik pemipetan kode 1-6 di media agar BHI yang mengandung *E. coli* O157:H7 ATCC 43984. Daerah bening pada titik pemipetan merupakan aktivitas faga HK dalam melisis *E. coli* O157:H7 ATCC 43984 dengan sempurna.



Gambar 2. Hasil Perbanyak faga dengan teknik *spot testing*

Penghitungan konsentrasi faga HK dari stok penyimpanan diperoleh sebanyak $6,35 \times 10^9$ PFU/ml. Konsentrasi faga dalam stok setelah disimpan masih sama dengan stok awal penyimpanan. Kemampuan faga untuk bertahan hidup dalam kondisi yang tidak menguntungkan (di luar tubuh inangnya) sangat beragam. Berbagai faktor fisik dan kimia eksternal, seperti suhu, keasaman, dan ion berpengaruh pada ketahanan faga untuk tetap hidup (Jończyk et al. 2011). Faktor suhu menjadi faktor yang sangat penting supaya faga dapat bertahan hidup. Suhu memainkan peran dalam penyimpanan dan pemrosesan lebih lanjut.

Di laboratorium, suhu penyimpanan faga dipertahankan tetap stabil pada suhu - 20°C (Gonzales-Menendes et al 2018).

Uji konsentrasi hambat minimal (KHM) dari faga HK terhadap *E. coli* O157:H7 dengan teknik dilusi cair

Hasil uji KHM faga HK ditunjukkan pada larutan BHIB pada tabung no 1 sampai dengan 7. Larutan BHIB pada tabung-tabung tersebut terlihat bening, hal ini menunjukkan bahwa faga HK mampu melisis bakteri dengan sempurna pada pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-7} . Pada tabung no. 8 sampai dengan 10 (pengenceran 10^{-8} sampai dengan 10^{-10}), larutan BHIB terlihat keruh karena *E. coli* O157:H7 masih tumbuh, dan faga HK belum mampu membunuh bakteri. Pengamatan hasil uji KHM dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Uji KHM faga HK terhadap *Escherichia coli* O157:H7

Tabel 1. Hasil Uji KHM dari faga HK terhadap *E.coli* O157:H7 dengan teknik dilusi cair

Pengenceran	Ulangan I	Ulangan II
10^{-1} ($6,35 \times 10^8$)	-	-
10^{-2} ($6,35 \times 10^7$)	-	-
10^{-3} ($6,35 \times 10^6$)	-	-
10^{-4} ($6,35 \times 10^5$)	-	-
10^{-5} ($6,35 \times 10^4$)	-	-
10^{-6} ($6,35 \times 10^3$)	-	-
10^{-7} ($6,35 \times 10^2$)	-	-
10^{-8} ($6,35 \times 10^1$)	+	+
10^{-9}	+	+
10^{-10}	+	+

KHM faga HK = 10^{-7} ($6,35 \times 10^2$) PFU/ml

Dari hasil dilusi cair, konsentrasi faga HK terhadap *E. coli* O157:H7 telah ditentukan pada pengenceran ke 10^{-7} dan diperoleh konsentrasi sebesar $6,35 \times 10^2$

PFU/ml (Tabel 1). Hasil penelitian sebelumnya dari Dallal et al. (2016) didapatkan hasil KHM faga, yaitu sebesar $1,3 \times 10^5$ PFU/ml. Apabila dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya, terlihat bahwa faga HK memiliki aktivitas bakteriostatik yang lebih rendah/peka terhadap *E. coli* O157:H7 (Cieplak et al. 2018).

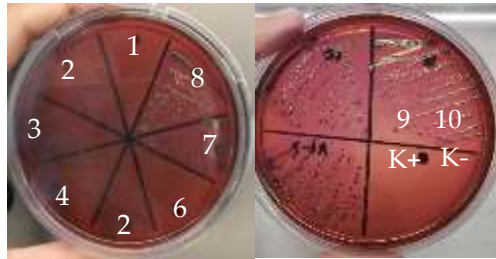
Uji konsentrasi bunuh minimal (KBM) faga HK terhadap *E. coli* O157:H7

Pada tabung KBM dengan pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-6} menunjukkan hasil larutan bening dan konfirmasi pada media EMBA tidak terdapat pertumbuhan bakteri *E. coli* O157:H7 (Tabel 2). Pada tabung-tabung pengenceran 10^{-7} sampai dengan 10^{-10} , larutan terlihat keruh dan uji konfirmasi pada media EMBA, terlihat *E. coli* O157:H7 tumbuh dengan ciri khas koloni bulat berwarna kilap hijau metalik (Gambar 4). Hasil KBM dari faga HK ditunjukkan pada pengenceran 10^{-6} , yaitu sebesar $6,35 \times 10^3$ PFU/ml. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Dallal et al. (2016), didapatkan hasil KBM faga, yaitu sebesar $1,3 \times 10^5$ PFU, sama dengan hasil KHM faga. Hal ini menandakan bahwa faga HK memiliki aktivitas sebagai bakterisidal lebih peka terhadap *E. coli* O157:H7 (Cieplak et al. 2018).

Tabel 2. Hasil uji KBM dari faga HK terhadap *E. coli* O157:H7 dengan teknik gores pada media EMBA

Pengenceran	Teknik Gores	
	Ulangan I	Ulangan II
10^{-1} ($6,35 \times 10^8$)	-	-
10^{-2} ($6,35 \times 10^7$)	-	-
10^{-3} ($6,35 \times 10^6$)	-	-
10^{-4} ($6,35 \times 10^5$)	-	-
10^{-5} ($6,35 \times 10^4$)	-	-
10^{-6} ($6,35 \times 10^3$)	-	-
10^{-7} ($6,35 \times 10^2$)	+	+
10^{-8} ($6,35 \times 10^1$)	+	+
10^{-9}	+	+
10^{-10}	+	+

KBM faga HK = 10^{-6} ($6,35 \times 10^3$) PFU/ml



Gambar 4. Hasil Uji KBM faga HK terhadap *E. coli* O157:H7 dengan teknik gores

Penentuan *multiplicity of infection* (MOI)

Pada penelitian ini didapatkan nilai MOI sebesar $0,9621 \times 10^{-6}$ PFU/CFU, yang menandakan bahwa sel inang rentan terhadap faga atau memiliki *host range*, yaitu *propagating range* (PR). Nilai MOI yang diperoleh di bawah 10 menunjukkan isolat faga HK bersifat sensitif, memiliki spektrum kerja yang spesifik pada reseptor yang terdapat pada permukaan dinding sel bakteri, serta dapat bermultiplikasi di dalam sel *E. coli* O157:H7 (Vipra et al. 2013). Nilai MOI yang diperoleh dapat berbeda di antara beberapa jenis faga, kemungkinan disebabkan adanya perbedaan konsentrasi stok faga, teknik untuk menentukan nilai KHM (mikrodilusi), strain bakteri, dan jumlah bakteri yang digunakan, serta afinitas terhadap reseptor pada permukaan dinding sel bakteri (Vipra et al. 2013); (Abedon 2016).

KESIMPULAN

Faga HK memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *E. coli* O157:H7 dengan nilai KHM sebesar $6,35 \times 10^2$ PFU/ml dan KBM sebesar $6,35 \times 10^3$ PFU/ml. Nilai MOI Faga HK sebesar $0,9621 \times 10^{-6}$ PFU/CFU dan memiliki kategori *host range* adalah *propagating range*. Nilai KBM faga HK yang telah diperoleh secara *in vitro* dapat digunakan sebagai dasar penentuan dosis aplikasi faga HK dalam membunuh bakteri *E. coli* O157H7 secara *in vivo* pada hewan coba maupun hewan target.

SARAN

Nilai KBM faga HK yang telah diperoleh secara *in vitro* dapat digunakan sebagai dasar penentuan dosis aplikasi faga HK dalam membunuh bakteri *E. coli* O157H7 secara *in vivo* pada hewan coba maupun hewan target.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian dan Balai Besar Penelitian Veteriner atas bantuan dana,

tempat dan materi percobaan. Kepada para teknisi di laboratorium *Enterobacteriaceae* dan pustakawan di Balai Besar Penelitian Veteriner serta berbagai pihak yang tidak dapat disebut satu per satu atas bantuan dan dukungannya selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abedon ST. 2016. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage*. 6:e1220348-1-6.
- Ackermann HW, Prangishvili D. 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol*. 157:1843-1849.
- Ariyanti T. 2016. Isolasi, karakterisasi, dan pemanfaatan *bacteriophage* untuk identifikasi *Escherichia coli* O157H7 [Disertasi]. [Jakarta (Indonesia)]: Universitas Indonesia.
- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Farooq MK, Salamat, Baloch Z. 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*. 11:1645–1658.
- Baehaqi KY, Putriningsih PAS, Suardana IW. 2015. Isolasi dan identifikasi *Escherichia coli* O157 : H7 pada sapi Bali di Abiansemal, Badung, Bali. *Indones Med Veterinus*. 4:267–278.
- Cieplak T, Soffer N, Sulakvelidze A, Nielsen DS. 2018. A bacteriophage cocktail targeting *Escherichia coli* reduces *E. coli* in simulated gut conditions, while preserving a non-targeted representative commensal normal microbiota. *Gut Microbes*. 9:391-399.
- Dallal MMS, Imeni SM, Nikkhahi F, Rajabi Z, Salas SP. 2016. Isolation of *E. coli* bacteriophage from raw sewage and comparing its antibacterial effect with ceftriaxone antibiotic. *Int J Adv Biotechnol Res*. 7:385-391.
- González-Menéndes E, Fernández L, Gutiérrez D, Rodrigues A, Martínez B, García P. 2018-Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PloS One*. 13:e0205728-1-9.
- Kazi M, Annapure US. 2016. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *J Food Sci Technol*. 53:1355-1362.
- Kiranmayi BC, Krishnaiah N, Mallika EN. 2010. *Escherichia coli* 0157: H7 - An emerging pathogen in foods of animal origin. *Vet World*. 3:382-389.
- Lee VC. 2015. The antibiotic resistance crisis: Part 2: Management strategies and new agents. *P&T*. 40:344-352.
- Lee YD, Kim JY, Park JH. 2013. Characteristics of coliphage ECP4 and potential use as a sanitizing agent for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Control*. 34:255-260.

- Mirzaei MK, Nilsson AS. 2015. Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One*. 10:1-13.
- Paul VD, Sundarrajan S, Rajagopalan SS, Hariharan S, Kempashanaiah N, Padmanabhan S, Sriram B, Ramachandran J. 2011. Lysis-deficient phages as novel therapeutic agents for controlling bacterial infection. *BMC Microbiol*. 11:195.
- Popa MP, McKelvey TA, Hempel J, Hendrix RW. 1991. Bacteriophage HK97 structure: wholesale covalent cross-linking between the major head shell subunits. *J Virol*. 65:3227-3237.
- Robinson AL, McKillip JL. 2010. Biology of *Escherichia coli* O157:H7 in human health and food safety with emphasis on sublethal injury and detection. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol*. p. 1096-1105.
- [SNI] Standar Indonesia Indonesia. 2008. Metode pengujian cemaran mikroba dalam daging, telur dan susu, serta hasil olahannya. Jakarta (Indonesia): Badan Standardisasi Nasional.
- Supar. 1996. Deteksi gen pengendali sintesis perlengkapan K88, K99 dan enterotoksin pada *Escherichia coli* yang diisolasi dari anak babi dan sapi penderita diare di Indonesia. *JITV*. 2:60-65.
- Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, Brabban AD, Diez-Gonzalez F. 2011. Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*. 110:1323-1331.
- Vipra A, Desai SN, Junjappa RP, Roy P, Poonacha N, Ravinder P, Sriram B, Padmanabhan S. 2013. Determining the minimum inhibitory concentration of bacteriophages: Potential advantages. *Adv Microbiol*. 3:181-190.
- Yıldırım Z, Sakin T, Çoban F. 2018. Isolation of anti-*Escherichia coli* O157:H7 bacteriophages and determination of their host ranges. *Turkish J Agric - Food Sci Technol*. 6:1200-1208.