

METODA PENGKAYAAN, FILTRASI DAN PERTUMBUHAN UNTUK ISOLASI BATERIOFAG SPESIFIK *SALMONELLA TYPHIMURIUM* PADA SAMPEL AIR

¹Sri Hartin Rahaju

¹Pusat Penelitian Biologi – LIPI, Jln. Raya Jakarta – Bogor Km 46, Cibinong
e-mail: hartinrm@yahoo.co.id

Abstrak. *Bateriofag adalah virus yang menginfeksi secara spesifik dan menjadi parasit dalam sel bakteri tertentu yang akhirnya membunuh sel tersebut. Salmonella typhimurium merupakan bakteri patogen yang berbahaya yang pernah menyebabkan wabah keracunan. Penelitian terhadap metoda pengkayaan, filtrasi dan pertumbuhan untuk isolasi bakteriofag spesifik S. typhimurium bertujuan untuk memperoleh bakteriofag spesifik S. typhimurium terseleksi untuk pengujian berkelanjutan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteriofag yang menginfeksi S. typhimurium secara visual dapat diamati dengan munculnya plak pada hasil plating pengenceran setelah melalui tahapan-tahapan, diantaranya dimulai dari peremajaan sel inang S. typhimurium, amplifikasi bakteriofag, filtrasi 1, filtrasi 2, uji infeksi dan visualisasi plak yang dihasilkan.*

Kata kunci: metoda, bakteriofag, *S. typhimurium*, sampel air

1. Pendahuluan

Bateriofag adalah virus parasit bakteri yang dapat menghancurkan sel bakteri dengan melisis dinding selnya (Calendar, 2004). Virus ini mengontrol populasi bakteri jenis tertentu secara spesifik dan efektif dengan menginjeksikan material genetiknya (DNA atau RNA) untuk bereplikasi dan berkembang menjadi partikel virus dengan menggunakan 'mesin reproduksi' sel bakteri untuk selanjutnya keluar dan menyebar dengan melisis sel tersebut. Karakter ini telah dimanfaatkan dalam pengembangan agen terapi baru untuk penyakit infeksi bakteri tidak saja dalam konteks manusia tetapi juga dalam bidang peternakan, pertanian dan perikanan (Sulakvelide dan Kutter, 2005). Berbagai jenis bakteri berkemungkinan dapat diinfeksi oleh sedikitnya satu jenis virus (Acheson, 2011). Diutamakan pemanfaatannya untuk terapi penyakit infeksi pada manusia, farmakokinetiknya telah diusulkan oleh Payne *et al* (2003). Sistem ini juga telah dikembangkan dalam sistem *delivery* obat tertentu (Yacoby *et al*, 2006). Karakter ini juga dapat dikembangkan untuk remediasi lingkungan seperti perairan yang tercemar bakteri patogen. Penggunaan bakteriofag ternyata relatif lebih efisien, spesifik dan *cost effective* (Parisien *et al*, 2007). Kelebihan ini disebabkan karena bakteriofag memproduksi enzim hidrolisis dinding sel dan peptida penyebab lesi membran sel serta merupakan agen hidup yang dapat dikembangkan secara biologis. Resistensi bakteri terhadap infeksi bakteriofag relatif kecil karena replikasi bakteriofag relatif lebih cepat dari mekanisme perubahan genetik bakteri dalam mengembangkan karakter resistensinya. Permasalahan yang dihadapi adalah resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik dari disinfektan yang mencemari lingkungan dapat ditanggulangi dengan mengupayakan pemanfaatan bakteriofag spesifik. Bateriofag dapat diisolasi dengan menginfeksikannya pada sel-sel inang spesifik yang ditumbuhkan pada medium agar yang sesuai. Infeksi yang terjadi dicirikan dengan adanya bagian lisis yang disebut dengan plak. Plak ini kemudian dicuplik untuk diisolasi dan dimurnikan bakteriofagnya. Isolasi dilakukan dengan sentrifus pada kecepatan *ultraspeed*.

Penelitian ini telah dilakukan seleksi sel inang bakteri dari famili Enterobacteriaceae yaitu *S. typhimurium*. Bakteri tersebut memiliki nilai penting dalam bidang kesehatan, terutama resistensi terhadap antibiotik, infeksi dan kontaminasi lingkungan. Isolat-isolat bakteriofag yang spesifik *S. typhimurium* yang telah terpilih akan diuji aktivitasnya. Bakteriofag yang menjadi sasaran penelitian ini adalah dari kelompok lisogenik yang spesifik menginfeksi bakteri *S. typhimurium*. Menurut WHO, demam tifoid terjadi sekitar 15 juta kasus pertahun di dunia dan Indonesia merupakan negara dengan angka kejadian demam tifoid yang tinggi yaitu sekitar 900.000 kasus pertahun disertai 20.000 kematian pertahun (Punjabi, 2004). Demam tifoid berada di urutan keempat dari 10 penyebab penyakit utama yang rawat inap di rumah sakit di Indonesia tahun 2003. Pada umumnya, serotipe Salmonella menyebabkan penyakit pada organ pencernaan disebarkan melalui makanan (foodborne diseases) dan penyakitnya disebut salmonellosis. Ciri-ciri orang yang mengalami salmonellosis adalah diare, keram perut, dan demam dalam waktu 8-72 jam, sakit kepala, mual dan muntah-muntah.

Virus tidak dapat tumbuh dan berkembang biak pada media mati dan membutuhkan sel hidup karena komponen virus dibuat dengan bantuan peralatan sel inang yang diserangnya sehingga virus merupakan parasit obligat intraseluler. Pembentukan komponen virus tersebut dimungkinkan karena virus merupakan parasit pada tingkat genetik, setelah menginfeksi sel, genomnya akan mempengaruhi kontrol mekanisme sintetik sel inang (Syahrurachman, 1993).

Virus dapat diisolasi dengan memperlihatkan kemampuannya untuk membentuk zona bening (*plak*) pada lapisan sel inangnya. *Plak* dapat dibentuk dari berbagai virus hewan pada lapisan tunggal jika hamparan sel dengan gel agarosa dijaga oleh virus pada zona beningnya. *Plak* juga dapat dibentuk oleh *phages* pada pertumbuhan bakteri. Hal ini diasumsikan bahwa *plak* merupakan hasil dari infeksi sel oleh virion tunggal. Virion merupakan sebutan lain untuk partikel dari virus. Ada juga kemungkinan bahwa *plak* merupakan bawaan dari dua atau lebih virion (Carter and Saunders, 2007).

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui bagaimana proses pengkayaan, filtrasi dan pertumbuhan serta kenampakan visual bakteriofag yang menginfeksi *S. typhimurium* pada sampel air.

2. Bahan dan Metoda

Sampling dilakukan pada sumber mata air yang belum tercemar. Peremajaan *S. typhimurium* (inang) dilakukan dan satu ose diinokulasikan pada 50 ml media cair Luria Bertani (LB) 1x diinkubasi (selama 24 jam pada suhu 37°C).

Amplifikasi bakteriofag dengan mencampur 2 ml sampel air dengan 1 ml media cair LB 10x serta diinokulasikan 1 ml kultur inang, kemudian diinkubasi dan menghasilkan bakteriofag. Sebagai kontrol yaitu 1 ml kultur inang diinokulasikan pada 3 ml media cair LB 1x dan diinkubasi.

Filtrat Bakteriofag I (FB I) dengan menpindahkan 4 ml kultur bakteriofag ke dalam tabung sentrifus, disentrifus (kecepatan 2000 rpm, 5 menit) diperoleh supernatan disaring (menggunakan 0,45 µm *syringe* tip filter steril), dihasilkan Filtrat Bakteriofag I (FB I). Perbanyakkan FB I dilakukan dengan menambahkan 4 ml FB I pada 1 ml media cair LB 10x, kemudian inokulasikan 5 ml kultur inang. Sebagai kontrol, pindahkan 4 ml kultur kontrol ke dalam tabung (sentrifus), disentrifus, diperoleh supernatant, kemudian disaring, dihasilkan Filtrat Kontrol (FK) I. Perbanyakkan FK I dengan menambahkan 4

ml FK I pada 1 ml media cair LB 1x kemudian inokulasikan 5 ml kultur inang dan diinkubasi.

Filtrat Bateriafag (FB) II dilakukan dengan memindahkan 4 ml FB I ke tabung sentrifus, disentrifus, diperoleh supernatan disaring, diperoleh FB II, disimpan dalam refrigator, (suhu 4°C). Sebagai kontrol, dipindahkan 4 ml FK I ke tabung sentrifus, disentrifus, diperoleh supernatant, disaring, diperoleh FK II lalu disimpan dalam refrigator.

Peremajaan inang (Log Phase) dilakukan satu ose kultur inang diinokulasi ke 9 ml LB 1x, diinkubasi selama 2-3 jam, ukur OD₆₀₀, apabila 0,5 yang diperoleh dapat dipergunakan untuk metode selanjutnya.

Uji Infeksi dilakukan pada enam eppendorf (2 ml) berisi 0,9 ml PBS ditambah 0,1 ml FB II, dihomogenkan (membolak-balik tabung), dilakukan seri pengenceran sampai tabung ke enam. Sebagai kontrol dilakukan pula seri pengenceran terhadap FK II dengan menambahkan 0,1 ml FK II ke dalam 0,9 ml PBS.

Enam eppendorf masing-masing berisi 0,5 ml inang *log phase* ditambah 0,1 ml dari setiap seri pengenceran pertama sampai ke enam, diinkubasi selama 10 menit dalam *water bath incubator* (suhu 37°C). Plating dilakukan dengan mencampurkan campuran yang telah diinkubasi dengan 7 ml LB semi solid secara hati-hati campuran dituang ke agar tersebar merata, diamkan 10 menit, diinkubasi demikian pula halnya untuk kontrol.

Setelah plak terbentuk maka bateriafag disolasi dan diinfeksi kembali untuk konfirmasi dan mendapatkan lebih banyak plak untuk dimurnikan melalui sentrifus, kemudian bateriafag disimpan dalam suspensi kloroform.

3. Hasil dan Pembahasan

Enterobacteriaceae merupakan salah satu family bakteri yang banyak dan mudah diinfeksi *bacteriophage*. Beberapa anggota Enterobacterioceae diantaranya yaitu *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* spp., dan *Klasiella* spp. *S. typhimurium* merupakan salah satu bakteri dari family Enterobacteriaceae yang dapat ditemukan didalam perairan seperti air keran, sungai, kolam, maupun danau. Bakteri ini ada yang tidak bersifat patogen, namun ada juga jenis yang patogen seperti *S. typhimurium* DT 104 dan *S. typhimurium* DT 204b yang pernah menyebabkan wabah keracunan di era tahun 2000-an. Maka dari itu, perlakuan atas jenis bakteri ini harus cukup berhati-hati (Sagoo *et al.*, 2003).

Sebelum dilakukannya isolasi virus adalah peremajaan sel inang *S. typhimurium*. Hasil pemurnian inang diuji dengan pewarnaan Gram menghasilkan bentuk sel bulat kemerahan menginterpretasikan sebagai bakteri Gram negatif. Setelah dilakukan pewarnaan Gram, inang tersebut diinokulasikan pada media cair LB 1x. Media cair tersebut termasuk ke dalam media pengkayaan (*rich media*) yaitu media dengan komposisi nutrien berlimpah (ekstrak) dan umum dipergunakan untuk pertumbuhan berbagai jenis mikroba. Komposisi dari media LB cair antara lain *Trypton* 1,0%, *Yeast Ekstrak* 0,5%, dan NaCl 0,5% dan dilarutkan dengan aquades sampai dengan 1000 ml (Jensen *et al.*, 1998). Pembuatan kultur cair inang dilakukan dengan mengambil satu - dua ose sel inang kemudian diinokulasikan ke dalam media LB cair. Hasil positif dari pertumbuhan inang pada media terlihat dengan warna awal media berwarna kuning pekat menjadi keruh setelah diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C.

Amplifikasi bakteriofag dari sampel air 40 ml dilakukan dengan menambahkan medium LB 10x sebanyak 5 ml. Penambahan LB 10x berfungsi sebagai medium pertumbuhan inang. Kultur inang cair hasil peremajaan juga ditambahkan pada campuran keduanya sebanyak 5 ml kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi tersebut merupakan kultur bakteriofag. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk kontrol namun tidak menggunakan air sampel melainkan menggunakan medium LB 1x sebanyak 45 ml.

Tahapan selanjutnya yaitu membuat filtrat bakteriofag I. Kultur bakteriofag hasil inkubasi diambil sebanyak 10 ml kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Sentrifus dilakukan guna memisahkan fragmen yang ringan dan bakteri lainnya dari medium kultur. Jika sentrifus tidak sempurna, filter membran akan tersumbat dengan cepat dan filtrasi akan maju perlahan-lahan. Untuk meminimalkan penyaring penyumbatan, prosedur sentrifus tiga akan digunakan. Untuk menghemat waktu dalam menyumbat filter, perakitan saringan tambahan dan pasokan yang cukup dari filter membran harus tersedia. Filter ini memiliki ukuran pori maksimum 0,45 mikron, yang memegang kembali semua bakteri, sehingga hanya virion bakteriofag yang melewatinya (Brown, 2001). Hasil sentrifus ini akan menghasilkan dua bagian pada tabung ependorf, yakni bagian yang mengendap di dasar ependorf (natan) dan larutan di bagian atasnya (supernatan). Bagian yang diambil adalah supernatannya.

Setelah disentrifus, filtrat yang cair tersebut disaring menggunakan *syringe* tip steril berpori 0,45 µm. Hasil dari penyaringan tersebut merupakan Filtrat Bakteriofag I. Filtrat Bakteriofag I tersebut diperkaya (*enrichment*) dengan cara diinokulasikan pada media LB cair 1x setelahnya diinokulasikan juga kultur inang dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Perlakuan tersebut juga dilakukan pada kontrol.

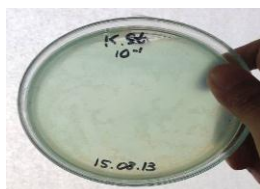
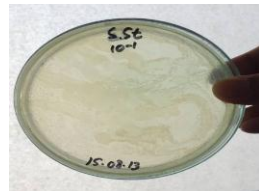
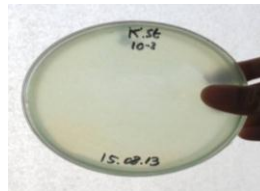
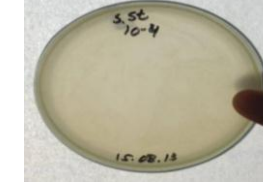
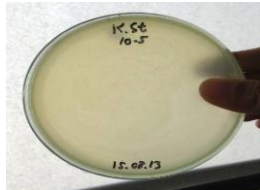
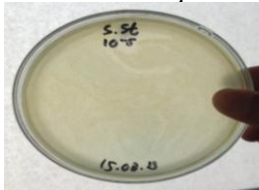
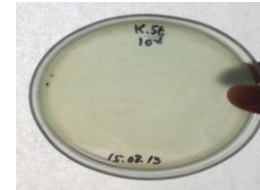
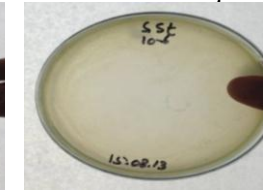
Setelah diinkubasi, filtratnya digunakan untuk menghasilkan Filtrat Bakteriofag II. Filtrat tersebut disentrifus kembali selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan yang dihasilkan disaring kembali menggunakan *syringe* tip steril berpori 0,45 µm. Hasil dari tahapan ini menghasilkan Filtrat Bakteriofag II (FB II). Filtrat ini bisa langsung diinfeksi kembali dengan inang atau bisa disimpan pada suhu refrigerator suhu 4°C untuk digunakan di kemudian hari. Tahapan yang sama juga dilakukan untuk kontrol.

Uji infeksi dapat dilakukan di hari yang sama atau mendinginkan filtrat di dalam kulkas terlebih dahulu. Uji infeksi dilakukan pada media LB padat. Media LB dituang pada cawan untuk persiapan uji infeksi. Reagen PBS disiapkan dan dituang sebanyak 0,9 ml ke ependorf yang selanjutnya akan dilakukan pengenceran. PBS merupakan sebuah larutan penyangga yang biasa digunakan dalam penelitian biologi. Buffer tersebut membantu untuk mempertahankan supaya pH konstan. PBS sering digunakan untuk mempertahankan osmolaritas sel. Garam mengandung ion, untuk menyeimbangkan jumlah ion garam di dalam sel. PBS sangat berguna untuk menjaga sel-sel pada osmolaritas tertentu, digunakan sebagai larutan penyangga dalam berbagai eksperimen untuk mempertahankan pH protein. Protein memerlukan kisaran pH tertentu untuk menjaga netralitas pada asam amino tertentu, untuk mempertahankan struktur protein agar tidak terdenaturasi.

Filtrat Bakteriofag II (FB II) 0,1ml masukkan ke ependorf pertama kemudian dihomogenkan, jika sudah homogen diambil 0,1 ml dari ependorf pertama dipindahkan ke ependorf ke dua, kemudian dihomogenkan, lakukan hal yang sama tersebut hingga pengenceran ke-6. Setelah dilakukan pengenceran, semua ependorf yang sudah dihomogenkan, ditambahkan kultur inang cair sebanyak 0,5 ml. Kultur inang cair

tersebut merupakan kultur inang yang diinokulasikan 3 jam sebelumnya. Kultur yang dibutuhkan untuk inang bakteriofag ini harus berada pada fase log. Hal ini disebabkan karena pada fase logaritmik atau eksponensial, sel berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang. Selama periode ini pertumbuhan seimbang, kecepatan peningkatan dapat diekspresikan dengan fungsi eksponensial alami. Sel membelah dengan kecepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan. Dalam hal ini terdapat keragaman kecepatan pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Setelah semua ependorf hasil pengenceran ditambahkan kultur inang cair, masing-masing ependorf dihomogenkan kemudian diinkubasi di water bath incubator dengan suhu 37°C selama 10 menit. Selama 10 menit diinkubasi di *waterbath*, media semisolid dapat dipanaskan sebentar supaya ketika diplating suhu media tidak terlalu panas, karena jika terlalu panas kemungkinan mikroba akan mati karena tidak tahan panas. Setelah 10 menit inkubasi, filtrat tersebut diplating dengan cara mencampurkan filtrat ke media semisolid kemudian ditebarkan di media LB padat. Hal tersebut dilakukan untuk semua pengenceran. Kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C untuk diamati.

Hasil *plating* bakteriofag dari pengenceran ke satu sampai pengenceran ke enam dibandingkan antara kontrol dengan perlakuan :

Gambar 1. Kontrol 10^{-1} Gambar 2. Sampel 10^{-1} Gambar 3. Kontrol 10^{-2} Gambar 4. Sampel 10^{-2} Gambar 5. Kontrol 10^{-3} Gambar 6. Sampel 10^{-3} Gambar 7. Kontrol 10^{-4} Gambar 8. Sampel 10^{-4} Gambar 9. Kontrol 10^{-5} Gambar 10. Sampel 10^{-5} Gambar 11. Kontrol 10^{-6} 

Gambar 12. Sampel



Gambar 13. Hasil Visualisasi Plak

Interpretasi positif adanya bakteriofag pada sel inang akan terlihat zona bening yang dikenal dengan sebutan *plak*. Hal ini dikarenakan virus menginjeksikan material genetiknya (DNA atau RNA) untuk bereplikasi dan berkembang menjadi partikel virus dengan menggunakan 'mesin reproduksi' sel bakteri untuk selanjutnya keluar dan menyebar dengan melisis sel tersebut. *Plak* tersebut kebanyakan tampak melingkar atau tidak beraturan. Dari keenam hasil *plating* menunjukkan bahwa pada pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} muncul adanya *plak*. *Plak* yang menginfeksi *S. typhimurium* berukuran lebih kecil dibandingkan dengan bakteriofag yang menginfeksi bakteri spesies lainnya. Bakteriofag dapat dengan mudah dipelajari dengan menginokulasi bakteri yang tumbuh dalam cawan petri. Banyak bakteriofag melisis sel inang mereka, dan ini menyebabkan lisis kerugian dalam difraksi cahaya yang mengarah ke pembukaan dari kultur bakteri berfungsi sebagai indikator replikasi bakteriofag (Cann, 2005).

Sebuah aplikasi kuantitatif sederhana lisis adalah untuk menyebarkan bakteri pada permukaan nutrisi agar dalam cawan petri dan menerapkan pengenceran suspensi bakteriofag. Bakteriofag menginfeksi bakteri dan melepaskan partikel keturunannya, yang kemudian bereplikasi. Daerah lisis dapat dilihat sebagai *plak* yang jelas dengan latar belakang berawan dari sel-sel yang tidak terinfeksi, yang tumbuh dalam beberapa lapisan pada permukaan agar dalam cawan petri (Cann, 2005).

Bakteriofag dapat menginfeksi hanya satu atau beberapa strain atau spesies bakteri, dan akan menyerap ke daerah tertentu dari selubung sel inang kemudian menembus sel inang dengan seluruh virion masuk ke sel genom. Bakteriofag kemudian akan melanjutkan siklus hidupnya. Keutamaan adsorpsi bakteriofag ke inang adalah fenomena yang dapat dimanfaatkan dalam biosorben berbasis bakteriofag. Setelah menembus sel, beberapa salinan bakteriofag dilepaskan. Bakteriofag menginfeksi sebagian besar isolat *Salmonella* dan relatif sedikit dari genera lain (Bennett *et al.*, 1997).

Hasil *plak* yang muncul dari hasil *plating* kemudian divisualisasikan dengan menggunakan mikroskop, dimana di bagian tengah terlihat lebih cerah dibanding sekitarnya. Hal ini menjelaskan bahwa bakteriofag telah menginfeksi sel inang *S. typhimurium* maka sel yang tumbuh menjadi semakin terkikis sehingga akan tampak zona bening yang disebut *plak*. Dalam teknik ini, pengenceran virus digunakan untuk menginfeksi monolayer sel kultur, yang kemudian ditutupi dengan media padat untuk membatasi difusi virus, sehingga membunuh sel lokal dan munculnya *plak* setelah monolayer bernoda. Setelah beberapa waktu virus menginfeksi sel, cairan media diganti dengan medium kultur semipadat yang mengandung polimer seperti agarosa atau karboksimetil selulosa, yang membatasi difusi partikel virus dari sel yang terinfeksi. Setelah jangka waktu tertentu, media biasanya terlihat terbentuk lubang-lubang di monolayer (*plak*). Oleh karena itu, setiap *plak* hasil dari infeksi dinyatakan dalam bentuk *Plak Form Unit* (PFU) (Cann, 2005).

Setelah *plak* terbentuk maka bakteriofag tersebut disolasi dan akan dilakukan pengujian yang berulang-ulang dengan menginfeksi kembali untuk konfirmasi dan memperoleh lebih banyak *plak* dan dimurnikan melalui sentrifus, kemudian bakteriofag disimpan dalam suspensi kloroform dalam refrigerator.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk mengembangkan bahan berpotensi antibakteri sebagai pengganti antibiotika dan alternatif penanggulangan infeksi dan pencemaran lingkungan oleh bakteri patogen yang multi resisten antibiotika. Isolasi bakteriofag dari daerah terkontaminasi bakteri patogen dan karakterisasi informasi biologis dan genetik secara spesifik akan memberikan peluang untuk digunakan dalam upaya mengontrol secara spesifik sel-sel inangnya, dalam hal ini sel-

sel bakteri terseleksi yang resisten terhadap antibiotika dan disinfektan. Kontrol dapat dilakukan dengan memperkaya replikasi bacteriophage pada sel inang yang sesuai dan mengaplikasikannya pada lingkungan, bahan atau obyek yang terkontaminasi bakteri resisten yang menjadi target, misalnya pada pakan ternak, ikan dan sediaan produknya seperti pada upaya mengontrol *Salmonella* pada buah segar (Leverentz *et al*, 2001) dan *E. coli* O157:H7 pada ruminansia (Sheng *et al*, 2006).

4. Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa bacteriophage yang menginfeksi *S. typhimurium* kenampakan visualnya dapat diamati dengan munculnya *plak* pada hasil *plating* pengenceran setelah melalui tahapan-tahapan diantaranya mulai dari peremajaan sel inang *S. typhimurium*, amplifikasi bacteriophage, filtrasi 1, filtrasi 2, uji infeksi dan visualisasi *plak* yang dihasilkan.

Saran untuk penelitian berkelanjutan sampai diperolehnya sediaan bacteriophage terhadap terapi *S. typhimurium* yang siap dipergunakan.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr. Novik Nurhidayat atas bantuan dan kerjasamanya serta kepada Ratih Melina Dewi dan Acun yang telah membantu di Lab. Genetika sehingga penelitian ini terlaksana dengan baik.

Daftar Pustaka

- Acheson H. Nicholas. 2011. *Fundamentals of Molecular Virology*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken.
- Brown E. Alfred. 2001. *Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology Eight Edition*. Mc-Graw Hill Companies. California.
- Bennett A. R., F. G. C. Davids, S. Vlahodimou, J. G. Banks and R. P. Betts. 1997. The Use of Bacteriophage-Based Systems for The Separation and Concentration of *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology*. Vol (83) : 259-265.
- Calendar, R. 2004. *The Bacteriophages*. Oxford University Press, Oxford.
- Cann J. Alan. 2005. *Principles of Molecular Virology*. Elsevier Academic Press. USA.
- Carter B. John and Saunders Venetia A. 2007. *Virology Principles and Applications*. John Wiley and Sons Ltd. England.
- Jensen, Ellen C., Holly S. Schrader, Brenda Rieland, Thomas L. Thompson, Kit W. Lee, Kenneth W. Nickerson, And Tyler A. Kokjohn. 1998. Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied And Environmental Microbiology*. 64 (2) : 575–580.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E., and Sulakvelidze, A. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: A model study. *J. Food Prot.* 64:1116-1121.

- Payne, R. J. H., and Jansen, V. A. A. 2003. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clinical Pharmacokinetics* 42:315-325.
- Parisien, A, B. Allain, J. Zhang, R. Mandevillen and C.G. Lan. 2008. Novel Alternatif to Antibiotics: Bacteriophages, Bakterial Cell Wall Hidrolases and Antimicrobial Peptides. Review Article. *Journal of Applied Microbiology* 104, p 1-13.
- Punjabi, N.H. 2004. *Interaksi Pejamu dengan Salmonella Typhi*. *Medika*. p.795-797.
- Sagoo, S. K., C. L. Little, L. Ward, I. A. Gillespie, and R. T. Mitchell. 2003. *Microbiological Study of Ready-to-Eat Salad Vegetables from Retail Establishments Uncovers a National Outbreak of Salmonellosis*. *J. Food. Prot.* Vol. 66 (3) : 403-409.
- Sheng, H., H.J. Knecht, L.T. Kudia, C.J. Hovde. 2006. Application of Bacteriophage to Control Intestinal Escherichia coli)157:H7 Level in Ruminantia. *App. Env. Microbial.* Vo. 72. No.8 p. 5359-5366.
- Sulakvelide, A and E. Kutter. 2005. Bacteriophages in Animal and Agribusiness. In *Bacteriophage Biology and Application*. CRC Press. Boca Reston, FL, p.335-380.
- Syahrurachman, A. 1993. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Yacoby, I., H. Bar, I. Benhar. 2007. targeted Drug Carrying Bacteriophage as Antibakterial Nannomedicine. *Antimicrobial Agnet and Chemotherapy*. Vol. 51 no.6 p.2156-2163