

# MODUL BAKTERIOFAG

## TEKNIK DASAR DETEKSI MOLEKULAR BAKTERIOFAG 2

Penyusun:

*Erlia Narulita, S.Pd., M.Si., Ph.D.*



FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2021



UNIVERSITAS JEMBER

# **MODUL BAKTERIOFAG**

---

**Teknik Dasar Deteksi Molekuler Bakteriofag 2**

## PCR

### A. Tujuan Praktikum

Mahasiswa diharapkan dapat memahami teknik dan metod PCR dengan sampel bakteriofag

### B. Uraian Konsep dan Teori

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode enzimatik yang digunakan untuk sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* (di luar tubuh organisme). PCR dalam prosesnya memerlukan beberapa komponen utama diantaranya yaitu DNA template, Oligonukleotida pendek atau primer, Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), Enzim DNA Polimerase, serta komponen pendukung lainnya seperti senyawa buffer. Proses PCR menggunakan menggunakan alat yang disebut dengan termosiklus (Termocycler). Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi. Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat yaitu denaturasi, annealing, dan pemanjangan (*extensi*) untai DNA (Nolan, 2013: 125).

Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya PCR-RFLP, PCR – RAPD, nested- PCR, Quantitative- PCR, RT- PCR dan inverse – PCR. Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Metode ini dikembangkan pertama kali oleh Kary B. Mulis pada tahun 1985 (Kartika, 2018: 23). Selain itu, PCR memiliki banyak aplikasi yang beragam dalam diagnosa penyakit menular untuk mendeteksi virus atau bakteri, dalam ilmu forensik, tes paternitas, aplikasi keamanan dan berbagai aplikasi komersial lainnya (Ahrberg, 2016: 586). Tahapan-tahapan Polymerase Chain Reaction (PCR) terdiri dari 4 tahapan, yaitu pradenaturasi, denaturasi DNA templat, penempelan (*annealing*) primer, dan polimerisasi (*extension*) rantai DNA (Najafov, 2017: 5).

### C. Metode Praktikum

#### Alat dan Bahan

- DNA bakteriofag
- KODone
- ddH<sub>2</sub>O

- forward primer dan reverse primer
- PCR tube
- Mikropipet dan tip
- thermal cycler
- ice box
- elektroforesis

### **Langkah Kerja**

3. Siapkan KODone dalam icebox sampai menjadi cair
4. Buatlah PCR mixture dengan komponen 12.5  $\mu$ l KODone, 9.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l bakterifag genom/sampel DNA bakteriofag, 1  $\mu$ l forward primer, dan 1  $\mu$ l reverse primer
5. Resuspensi PCR mixture agar homogen
6. Atur thermal cycler dengan suhu pra-denaturasi 94°C selama 2 menit, denaturasi 98°C selama 10 detik, annealing 60°C selama 30 detik, extension 68°C selama 30 detik, dan final extension 12°C dengan siklus 30 kali.
7. Masukkan PCR mixture pada thermal cycler dan klik running
8. Setelah running selesai cek dengan elektroforesis

### **D. Daftar Pustaka**

- Ahrberg, Christian D., Ilic, Bojan Robert., Manza, Andreas and Neužil, Pavel. 2016. Handheld real-time PCR device. *The Royal Society of Chemistry*. 16(3): 586
- Kartika, Aprilia Indra. 2018. Optimasi Annealing Temperature Primer mRNA RECK dengan Metode One Step qRT-PCR. *Jurnal Labora Medika*. 2(1)\_ 22-31
- Najafov, Ayaz., Hoxhaj. 2017. Gerta. *PCR GURU An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologist*. United States: Academic Press
- Nolan, Tania., A. Bustin, Stephen. 2013. *PCR Technology Current Innovations*. New York: CRC Press

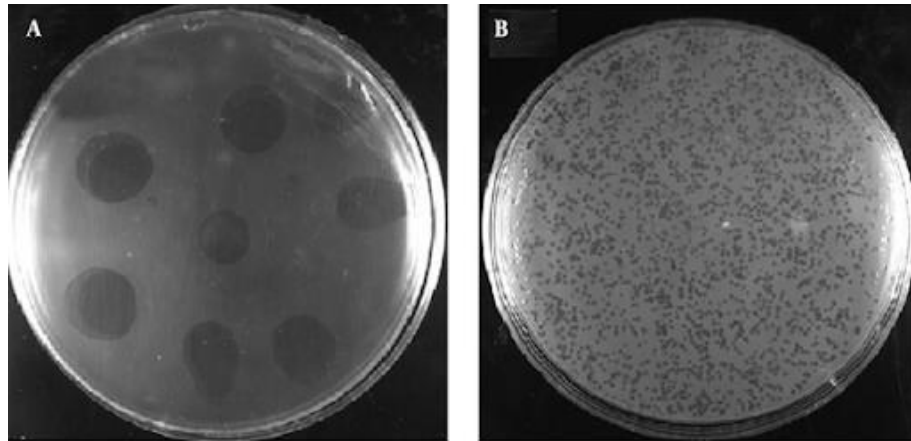
## SPOT ASSAY DAN PLAQUE ASSAY

### A. Tujuan Praktikum

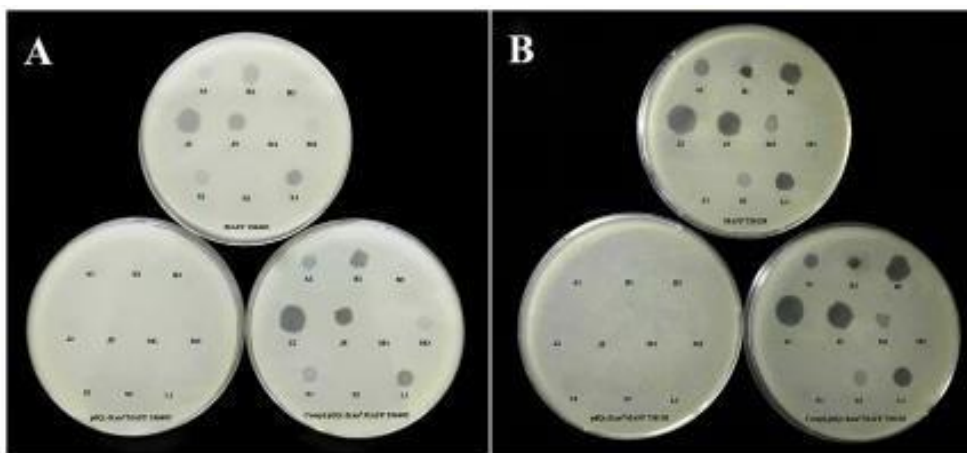
Mahasiswa mampu memahami dan mendeskripsikan metode spot assay dan plaque assay

### B. Uraian Konsep dan Teori

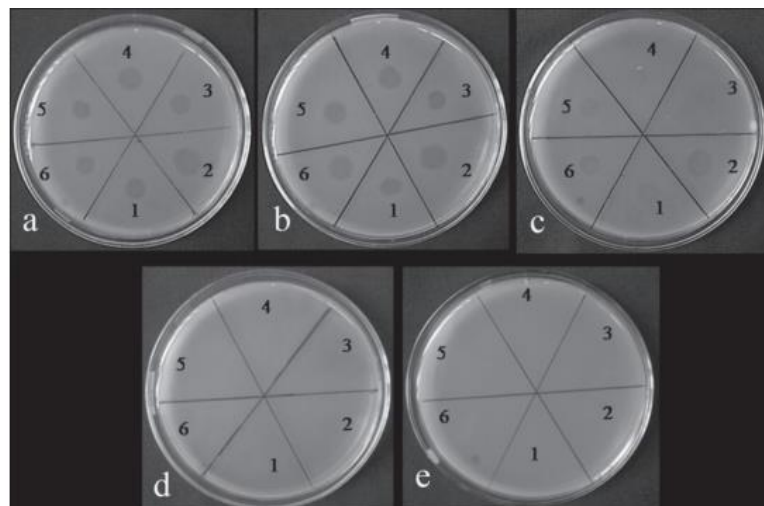
Bakteriofag memiliki banyak peran dalam berbagai bidang diantaranya peran bakteriofag (fag) sebagai obat alternatif profilaksis dan terapeutik untuk melawan strain MDR strain yang menyebabkan infeksi patogen semakin penting. Untuk mengatasi ketidakefektifan antibiotik dalam mengatasi bakteri patogen seperti penelitian oleh (Iqbal, et. Al, 2020) mengkombinasikan antibiotik dan bakteriofag atau Phage-Antibiotic Synergism (PAS) untuk meningkatkan kemampuan antibiotik dalam mengatasi bakteri akibat keracunan makanan. Serta peran lain yaitu bakteriofag *R. solanacearum* yang dapat dijadikan sebagai agen biokontrol (Bhunchoth, et Al. 2015). Adapun beberapa metode yang pada umumnya digunakan untuk mengetahui unit infeksi virus yaitu “plaque assay dan spot assay”. Wilayah khusus yang terlihat lebih terang pada permukaan medium daripada wilayah lainnya merupakan indikasi ketika virus telah memulai infeksi pada inang (bakteri) sehingga melisisikan bakteri tersebut dan membentuk zona bening. Wilayah terang inilah yang disebut sebagai “plaque” dan diasumsikan, bahwa setiap “plaque” berasal dari 1 partikel virus. “Plaque” merupakan jendela pada lapisan inang yang menyebar pada permukaan media plate /agar. “Plaque” dapat dilihat jika partikel virus/bakteriofage dicampur dengan TOP agar untuk membentuk lapisan tipis yang berisi inang bakteri yang ditumbuhkan dalam media agar (Brock and Madigan, 1991). Berbeda dengan palque assay yang dicampurkan langsung dengan TOP agar, spot assay hanya diteteskan dengan volume tertentu pada permukaan TOP agar agar yang sudah berisi bakteri. Metode plaque assay pada umumnya digunakan untuk propagasi atau perbanyak plaque serta plaque assay biasanya juga digunakan untuk virulence assay atau uji kemampuan infeksi bakteriofag kepada bakteri (Narulita, et al., 2020). Sedangkan spot assy untuk menguji kisaran inang (Narulita, 2016) atau menentukan titer bakteriofag.



(Gambar 1. Hasil spot assay (A), Hasil plaque assay (B))



Contoh spot assay Infektivitas berbagai fag terhadap sel *R. solanacearum* (Narulita, et al., 2016).



Contoh uji host range menggunakan spot assay bakteri penginfeksi *E.coli* (Narulita, et al., 2018).

## **A. Metode Praktikum**

### **Alat dan bahan**

- TOP Agar
- Bakteri *E.coli*
- Luria Bertani *broth*
- LB Plate
- Inkubator
- mikropipet

### **Langkah kerja**

#### **Plaque assay**

1. Tumbuhkan inang bakteri *E.coli* dalam media Luria Bertani *broth* dan inkubasi pada suhu 37°C dalam semalam
2. Encerkan stok bakteriofag hingga mendapatkan konsentrasi dengan *plaque* yang dapat dihitung (konsentrasi optimum)
3. Siapkan media LB *plate* dengan komponen 1% polypeptide, 1% NaCl, 0,5% *yeast*, dan 1,5% agar dan TOP agar 0,5% dengan komponen 1% polypeptide, 1% NaCl, 0,5% *yeast*, dan 0,75% agar
4. Hitung OD suspensi bakteri dengan standart OD 1 @1000 µl
5. Campurkan 240 µl bakteri dengan 10 µl bakteriofag yang telah diencerkan (*mixture*)
6. Campurkan 5 ml TOP agar yang sudah direbus dalam microwave dan didinginkan hingga suhu menurun (hangat) dengan *mixture* yang sudah dibuat.
7. Tuangkan pada LB plate dan inkubasi pada suhu 37°C dalam semalam

#### **Spot assay**

1. Tumbuhkan inang bakteri *E.coli* dalam media Luria Bertani *broth* dan inkubasi pada suhu 37°C dalam semalam
2. Encerkan stok bakteriofag/ buat serial delution untuk beberapa macam konsentrasi bakteriofag
3. Siapkan media LB *plate* dengan komponen 1% polypeptide, 1% NaCl, 0,5% *yeast*, dan 1,5% agar dan TOP agar 0,5% dengan komponen 1% polypeptide, 1% NaCl, 0,5% *yeast*, dan 0,75% agar
4. Hitung OD suspensi bakteri dengan standart OD 1 @1000 µl

5. Campurkan 250 µl bakteri dengan dengan standart OD 1 @1000 µl dengan 5 ml TOP agar hangat yang yang masih cair
6. Tuangkan pada LB plate
7. Teteskan 2-5 µl hasil serial delution bakteriofag pada permukaan TOP agar
8. Inkubasi pada suhu 37°C dalam semalam

## B. Daftar Pustaka

- Bhunchoth, A., Phironrit, N., Leksomboon, C., Chatchawankanphanich, O., Kotera, S., Narulita, E., Kawasaki, T., Fujie, M., M and Yamada, T. 2015. Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.12763: 1023-1033.
- Brock, T. D., M. T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6<sup>th</sup> Ed. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey.
- Iqbal, Mochammad., E., Narulita., F., Zahra., S., Murdiyah. 2020. Effect of Phage-Antibiotic Synergism (PAS) in increasing antibiotic inhibition of bacteria caused of foodborne diseases. *The journal of infection in developing countries*. 14(5), 488-493, doi:10.3855/jidc.12094
- Jamal, Muhsin., T., Hussain., C., R, Das., and S., Andleeb. 2015. Isolation and Characterization of a *Myoviridae* MJ1 Bacteriophage Against Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* 3. *Jundishapur J Microbiol*. 8(11): e25917. doi: 10.5812/jjm.25917.
- Narulita E, Addy HS, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. 2016. The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in *phage* infection in *Ralstonia solanacearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 : 868 872.
- Narulita, Erlia., I., Sulistyorini., G, P., Aji., M., Iqbal., And S., Murdiyah. 2018. Isolation And Characterization Of Bacteriophage In Controlling *Escherichia Coli* In Jember Area, Indonesia. *Asian Journal Of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences Paper*, 20(2), 439-444.
- Narulita, Erlia., G, P., Aji., B., Wahono., S., Murdiyah., R., Yulian. 2020. Synergism of Phage  $\Phi$ pt1b and Antibiotics For Reducing Infection of *Escherichia Coli*. *Biogenesis*, 8(1), 2580-2909, Doi <https://doi.org/10.24252/Bio.V8i1.11280>





FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2021